

**Interferon Regulatory Factor 1 –
Proliferationskontrolle und
Kooperation mit onkogenen Signalen in der Apoptoseinduktion**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat)
genehmigte
DISSERTATION

**von Katharina Schroeder
aus Trier**

1. Referent(in): Prof. Dr. Jürgen Bode

2. Referent(in): Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch

eingereicht am: 7.6.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 18.10.2001

„The answer to the first question is probably ‘Look and you will find’, whereas the answer to the second is less clear.” (Sachs, 2000)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.1.	Der Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1)	1
1.1.1.	Das Interferon-System und die Interferon Regulatory Factor-Familie	1
1.1.2.	Eigenschaften von IRF-1	2
1.1.2.1.	Proliferationshemmung durch IRF-1	4
1.1.2.2.	Tumorsuppressoraktivität von IRF-1	6
1.1.3.	Praktische Nutzung von IRF-1	8
1.1.3.1.	Proliferationskontrolle in der Biotechnologie	9
1.1.3.2.	Tumortheraeutisches Potential	10
1.2.	Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	11
1.2.1.	Die Human Epidermal Growth Factor-like Receptor (HER)-Familie	11
1.2.2.	EGFR-vermittelte Signalwege	12
1.2.2.1.	Der Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg	12
1.2.2.2.	Der Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase-Signalweg	14
1.2.2.3.	Der Phospholipase C/Proteinkinase C (PLC/PKC)-Signalweg	14
1.2.2.4.	Interaktionen zwischen EGFR-Signalwegen	15
1.3.	Kooperation von IRF-1 und EGFR in der Apoptoseinduktion	16
1.4.	Ausgangsbasis und Problemstellung	18
II.	Ergebnisse	20
2.1.	Die Entwicklung eines Selektionssystems für hochexprimierende Zellen am Beispiel von IRF-1	20
2.1.1.	Die Fusion von IRF-1-hER und enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) zum Expressionsmonitoring	21
2.1.2.	Die IRF-1-hER-Neomycinphosphotransferase-Fusion zur Expressionsstabilisierung und als Selektionssystem für hochexprimierende Zellklone	23
2.2.	Anwendung des proliferationsinhibitorischen Potentials von IRF-1 zur Regulation des Wachstums von Helferzellen bei der Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen	28
2.2.1.	Wachstumsregulation in einer humanen Stromazelllinie durch IRF-1-hER	28
2.2.2.	Konservierung der Zelloberflächenmarkerexpression und der Cytokinproduktion in der IRF-1-hER-regulierten Stromazelllinie	30
2.2.3.	Erhaltung der zur Kokultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen notwendigen Eigenschaften in der IRF-1-hER-regulierten Stromazelllinie	33
2.3.	Apoptoseinduktion durch Synergismus von IRF-1 und EGFR	38
2.3.1.	Kooperation von IRF-1 und EGFR in der Induktion von Promotoren	38
2.3.2.	Kinetik des IRF-1/EGFR-induzierten Zelltodes	40
2.3.3.	Analyse und Inhibition von EGFR-vermittelten Signalwegen	42
2.3.3.1.	Die Expression dominant negativer STAT-Isoformen blockiert den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod	43
2.3.3.2.	Die Beteiligung des MAP-Kinase-Signalweges	45
2.3.4.	Interaktionen zwischen den STAT- und MAP-Kinase-Signalwegen	49

2.3.5.	IRF-1 kooperiert mit MEK bei der Auslösung des Zelltodes in verschiedenen Zelllinien	51
2.3.6.	H-rev107 wird direkt durch IRF-1 induziert	54
III.	Diskussion	57
3.1.	Die IRF-1-hER-Fusionsproteine zur Selektion hochexprimierender Zellklone	57
3.2.	Proliferationskontrolle durch IRF-1 in Stromazellen	59
3.3.	Apoptoseinduktion durch Synergismus von IRF-1 und EGFR	60
IV.	Zusammenfassung	68
V.	Material und Methoden	69
5.1.	Material	69
5.1.1.	Material für die molekularbiologischen Versuche	69
5.1.1.1.	Puffer und Lösungen	69
5.1.1.2.	Bakterienstamm und Bakterienkulturreagenzien	69
5.1.1.3.	Antikörper und Proteinmarker	69
5.1.2.	Material für die Zellkultur	70
5.1.2.1.	Zelllinien	70
5.1.2.2.	Viren	70
5.1.2.3.	Plasmide	70
5.1.2.4.	Zellkulturreagenzien	71
5.1.2.5.	Induktoren und Inhibitoren	71
5.2.	Methoden	72
5.2.1.	Klonierung und Plasmidpräparation aus Bakterien	72
5.2.1.1.	Polymerasekettenreaktion	72
5.2.1.2.	Manipulation von DNA	72
5.2.1.3.	Plasmidpräparation aus Bakterien	73
5.2.2.	Langzeitlagerung von Zellen	73
5.2.3.	Bestimmung von Zellzahlen und Proliferation von Säugerzellen	73
5.2.4.	Transfektion von Säugerzellen	73
5.2.5.	Reporterassays und Proteingehaltsbestimmung	74
5.2.6.	Messung der Cytokinproduktion	75
5.2.7.	Immunpräzipitation und Western Blot	75
5.2.8.	FACS-Analyse	76
5.2.9.	Kokultur von hämatopoetischen Stammzellen mit Stromazellen	76
VI.	Literatur	77
VII.	Abkürzungsverzeichnis	84
VIII.	Danksagung	86
IX.	Lebenslauf	87

I. Einleitung

1.1. Der Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1)

1.1.1. Das Interferon-System und die Interferon Regulatory Factor-Familie

Interferone (IFN) sind sekretierte Proteine, die eine Funktion in der antiviralen Abwehr, der Zellwachstumsregulation und der Modulierung des Immunsystems ausüben. Der Name leitet sich von der Interferenz dieser Substanzen mit der viralen Replikation ab. Interferone wirken in Zielzellen, indem sie an deren IFN-Oberflächenrezeptoren binden und über den Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg die Induktion von Proteinen bewirken, welche die biologischen Funktionen der Interferone vermitteln. Interferone vom Typ I (IFN- α und IFN- β) werden von Virus-infizierten Zellen sekretiert und stellen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine schnelle Antwort auf eine Virus-Infektion dar. Interferone vom Typ II (IFN- γ) werden hingegen ausschließlich von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen produziert und sind notwendig für das Ingangsetzen der adaptiven Immunantwort und der Pathogen-Beseitigung (JONASCH und HALUSKA, 2001).

Die Voraussetzungen zur Aktivierung des IFN- β -Genes nach einer Virus-Infektion sind besonders gut untersucht. Die Bildung eines sog. „Enhanceosoms“ aus einer Reihe von Transkriptionsfaktoren auf dem IFN- β -Promotor bewirkt das Ablesen des Genes (THANOS *et al.*, 1995). Zu den benötigten Transkriptionsfaktoren gehören auch Mitglieder der Familie der Interferon Regulatory Factors (IRFs).

Der Prototyp der IRFs, IRF-1, wurde zwar durch seine Fähigkeit, an den IFN- β -Promotor zu binden, entdeckt, doch werden die IRFs nicht nur in der IFN-Regulation benötigt. Tatsächlich sind hauptsächlich IRF-3 und IRF-7 an der Induktion der IFN- β -Expression beteiligt. IRFs spielen zusätzlich eine wichtige Rolle in unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der Pathogen-Abwehr, der Cytokin-Signaltransduktion, der Zellwachstumsregulation und der Differenzierung hämatopoetischer Zellen (NGUYEN *et al.*, 1997a; MAMANE *et al.*, 1999).

Die Familie der IRFs umfaßt zur Zeit zehn Transkriptionsfaktoren (Tabelle 1). Die Mitglieder weisen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne im N-Terminus eine hohe Sequenz-Homologie auf. Insbesondere ein Motiv von fünf Tryptophanresten innerhalb einer Helix-Turn-Helix-Struktur ist in ihnen allen konserviert. Diese Struktur vermittelt die Bindung an

ähnliche DNA-Motive in den Promotorregionen bestimmter Gene (ESCALANTE *et al.*, 1998). Je nach dem Effekt, den das Mitglied hauptsächlich auf die Transkription der entsprechenden Gene ausübt, unterteilt man die IRF-Familie in drei Subgruppen: In Aktivatoren (IRF-1, IRF-3, p48), in Repressoren (ICSBP, virale IRFs) und in bifunktionale Aktivatoren/Repressoren (IRF-2, IRF-4, IRF-7). IRF-5 und IRF-6 sind nicht klassifiziert.

IRF-1 und IRF-2 binden an die gleichen DNA-Sequenzen (TANAKA *et al.*, 1993) und stellen durch ihre gegensätzliche Wirkung auf die Transkription ein antagonisierendes Paar dar. Die Balance zwischen diesen beiden Faktoren bestimmt darüber, ob ihre Zielgene exprimiert werden oder nicht (HARADA *et al.*, 1989).

Tab. 1: Die Interferon Regulatory Factor-Familienmitglieder

IRF-Mitglied	Expression	Funktion
IRF-1	ubiquitär	Immunregulation, Zellwachstumsregulation, Tumorsuppression
IRF-2	ubiquitär	Antagonisierung von IRF-1
IRF-3	ubiquitär	IFN-Induktion, Virus-Abwehr
IRF-4	Lymphozyten	B-Zell-Entwicklung, T-Zell-Aktivierung
IRF-5	unbekannt	unbekannt
IRF-6	unbekannt	unbekannt
IRF-7	ubiquitär	IFN-Induktion, Virus-Abwehr
IRF-8 / ICSBP*	Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen	Entwicklung myeloider Zellen, Lymphozytenaktivierung
IRF-9 / p48	ubiquitär	Typ I-IFN Signaltransduktion
vIRFs	Human Herpes Virus 8-infizierte Zellen	Hemmung der zellulären IRF-Wirkung

* Interferon Consensus Sequence Binding Protein

1.1.2. Eigenschaften von IRF-1

Der Transkriptionsfaktor Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) ist aus mehreren Domänen unterschiedlicher Funktion aufgebaut (Abbildung 1). Die Aktivität der individuellen Domänen ist von der Gesamtstruktur unabhängig, wie es für ein modulares Protein typisch ist. IRF-1 ist ein nukleäres Protein (SCHAPER *et al.*, 1998), das an definierte DNA-Motive in den Promotorregionen bestimmter Gene binden kann. Es erkennt die Konsensussequenz G(A)AAANNGAAA (TANAKA *et al.*, 1993). Durch Beeinflussung der Aktivität des basalen Transkriptionskomplexes, der sich um die TATA-Region organisiert, induziert IRF-1 die Transkription seiner Zielgene (WANG *et al.*, 1996).

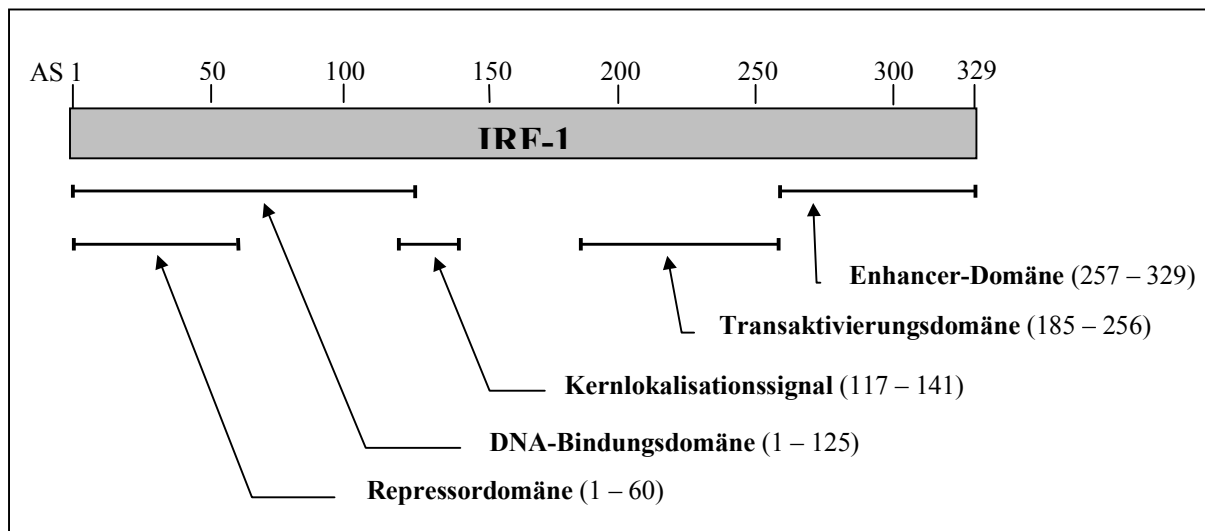


Abb. 1: Domänenstruktur des murinen IRF-1

IRF-1 wird in fast allen Zellen in geringem Maße exprimiert. Durch Virus-Infektion, doppel-strängige RNA, Interferone und eine Anzahl anderer Cytokine wie Interleukine, Tumor Necrosis Factor (TNF- α), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), sowie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und weitere biologisch aktive Proteine und Verbindungen kann seine Expression zusätzlich induziert werden (MIYAMOTO *et al.*, 1988; FUJITA *et al.*, 1989a; HARADA *et al.*, 1989; ABDOLLAHI *et al.*, 1991).

Als Mediator verschiedener externer Signale wird IRF-1 nicht nur auf transkriptioneller Ebene sondern auch posttranslational reguliert. Phosphorylierung von IRF-1 durch Casein Kinase II (CKII) verstärkt das Transaktivierungspotential von IRF-1 (LIN und HISCOTT, 1999). Die IRF-1-Aktivität wird außerdem durch Homo- und Heterodimerisierung beeinflusst. Onkogene wie die zur IRF-Familie gehörenden Proteine IRF-2 und ICSBP wirken in einem Komplex mit IRF-1 repressorisch (NELSON *et al.*, 1993), der Transaktivator NF- κ B hingegen verstärkend auf die IRF-1-Aktivität. Eine Interaktion von IRF-1 mit der Histonacetylase PCAF, die eine Öffnung der Chromatinstruktur und damit eine verstärkte Transkription eines Genes bewirkt, ist ebenfalls beschrieben (MASUMI *et al.*, 1999).

Mäuse, in denen das IRF-1-Gen ausgeschaltet wurde, zeigen einen Phänotyp, der sich nur wenig vom Wildtyp unterscheidet. IRF-1-knock-out-Mäuse weisen keine Abnormalitäten bezüglich Größe, Verhalten, Reproduktionsfähigkeit und Lebenserwartung auf. Lediglich Defekte in der Entwicklung von Zellen des Immunsystems, insbesondere von CD8⁺ T-Zellen (MATSUYAMA *et al.*, 1993) und von Natürlichen Killerzellen (OTHEKI *et al.*, 1998), treten auf.

Trotz dieser relativ geringen Auswirkungen, die das Fehlen von IRF-1 in Mäusen hervorruft, wurden eine Reihe wichtiger Funktionen von IRF-1 nachgewiesen. Ein relativ breites Spektrum von Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften, die in verschiedene Signalwege münden, werden durch IRF-1 induziert. IRF-1- und Interferon-induzierte Gene überlappen dabei zum Teil. Antivirale, antiproliferative, immunmodulatorische und tumorsuppressive Effekte sind als Folge der IRF-1-Aktivierung beschrieben (Abbildung 2). Der genaue Mechanismus ist allerdings für keine dieser Eigenschaften geklärt.

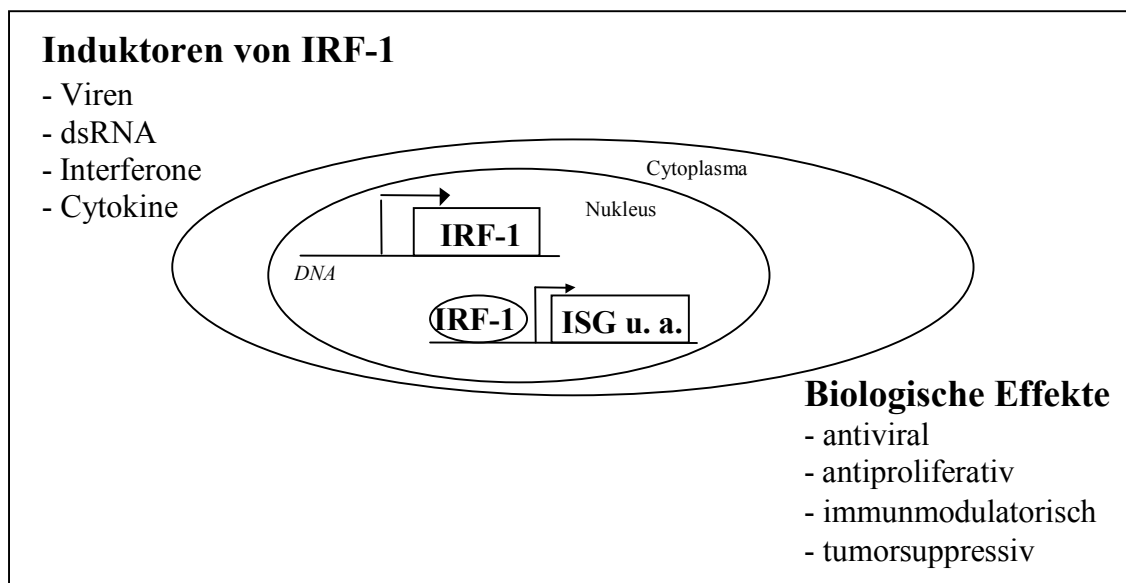


Abb. 2: Induktoren und biologische Effekte von IRF-1

1.1.2.1. Proliferationshemmung durch IRF-1

Die Höhe der IRF-1-Expression ist Zellzyklus-abhängig und am höchsten in der frühen G1-Phase. Die Expression des Gegenspielers IRF-2 bleibt hingegen unverändert, so daß sich das Gleichgewicht dieser beiden um DNA-Bindungsstellen kompetitierenden Faktoren im Laufe des Zellzyklus' verschiebt (HARADA *et al.*, 1993).

Einige IRF-1-aktivierte Gene tragen zu einer Verlangsamung des Zellwachstums bei. Der antiproliferative Effekt ist nicht auf ein Anhalten im Zellzyklus zurückzuführen. Vielmehr werden sämtliche Phasen zeitlich ausgedehnt (KIRCHHOFF *et al.*, 1993 und 1995). Die durch IRF-1 induzierten Faktoren Interferon- β und der Zellzyklusinhibitor p21 (TANAKA *et al.*, 1996), die beide eine Arretierung in der G1-Phase auslösen, scheinen deshalb nicht oder nicht alleine für die Wachstumsinhibition verantwortlich zu sein.

Bestimmte Proteine, deren Gene durch IRF-1 induziert werden, inhibieren die Proteinsynthese durch Abbau von mRNA oder durch Blockierung des Translationsapparates

der Zelle. Das Enzym Oligoadenylatzyklase (OASE) zählt hierzu (BENECH *et al.*, 1987). Die Polymerisation von ATP zu einer Reihe von 2'-5'-verbundenen Oligomeren, die durch die OASE katalysiert wird, aktiviert eine Endoribonuklease, die ihrerseits RNA abbaut. Ein zweites Protein ist die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) (KIRCHHOFF *et al.*, 1995). Dieses Enzym autophosphoryliert sich nach Bindung doppelsträngiger RNA und wird so aktiviert. PKR phosphoryliert den Initiationsfaktor eIF2 der eukaryontischen Proteinsynthese und inhibiert dadurch die Translation. Die Expression einer katalytisch-inaktiven dominant-negativen PKR-Mutante unterdrückt die antiproliferative Wirkung von IRF-1, allerdings auch die Expression anderer IRF-1-induzierter Gene (KIRCHHOFF *et al.*, 1995). Die beschriebenen Moleküle PKR und OASE hemmen zudem die virale Proteinsynthese und scheinen deshalb, neben der Induktion des antiviral wirkenden Interferon- β , auch für die Etablierung eines antiviralen Status' in der Zelle verantwortlich zu sein.

Eine Reihe weiterer Gene kommt für die Vermittlung des antiproliferativen Effektes von IRF-1 in Betracht. Die Expression von Mitgliedern der Familie der Schlafen (Slfn)-Gene kann durch IRF-1 induziert werden (J. Zerrahn, Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin, persönliche Mitteilung) und reduziert das Zellwachstum von Fibroblasten und anderen Zellen (SCHWARZ *et al.*, 1998). Slfn-Gene werden hauptsächlich in lymphoiden Geweben exprimiert; die Expression in anderen Geweben ist unterschiedlich für die einzelnen Familienmitglieder. Eine Rolle in der T-Zell-Entwicklung wurde für Slfn-1 nachgewiesen. Slfn-1-knock-out-Mäuse zeigen jedoch weder bezüglich der T-Zell-Entwicklung, noch in irgendeiner anderen Hinsicht einen Phänotyp, der sich vom Wildtyp unterscheidet (SCHWARZ *et al.*, 1998). Da ihre Proteinstruktur keine Ähnlichkeit mit bekannten Motiven aufweist, ist die Art und Weise, in der Slfn-Gene das Zellwachstums beeinflussen, bisher nicht bekannt.

Interferone sind zwar nicht wesentlich für den wachstumshemmenden Effekt von IRF-1 verantwortlich (KIRCHHOFF *et al.*, 1995), doch spielt umgekehrt IRF-1 bei der Vermittlung des antiproliferativen Effektes von Interferonen vermutlich eine Rolle. So induziert Interferon über die Induktion von IRF-1 verschiedene Gene, die das Zellwachstum bremsen. Neben den schon beschriebenen Genen kommen deshalb noch weitere in Betracht, die bisher nur als IFN-induzierte, nicht aber IRF-1-induzierte Faktoren erkannt wurden.

Hemopoietic Interferon-inducible Nuclear proteins with a 200-amino-acid repeat (HIN-200-Proteine) stellen eine Familie verwandter Moleküle dar, die eine Rolle in der Zellwachstumsregulation und Tumorsuppression spielen (JOHNSTONE und TRAPANI, 1999). Interferone sowohl vom Typ I als auch vom Typ II induzieren die Expression sämtlicher HIN-200 Mitglieder. Zwei Mechanismen durch die HIN-200-Proteine ihre biologischen Effekte

vermitteln sind bekannt. Zum einen inhibieren sie die Transkription bestimmter Gene, indem sie mit Transkriptionsfaktoren assoziieren und entweder deren Bindung an Promotoren verhindern oder das Zusammensetzen des basalen Transkriptionskomplexes auf den Promotorstellen blockieren (MIN *et al.*, 1996). Sie können zudem auch direkt als Repressoren wirken. Zum anderen binden sie an Proteine, die für die Regulation des Zellzyklus` wichtig sind (CHOUBEY und LENGYEL, 1995). Verlangsamung des Wachstums von verschiedenen Zelllinien (LEMBO *et al.*, 1995; YAN *et al.*, 1999) und eine Verringerung des Transformationsgrades von Prostata- und Brustkrebszellen (YAN *et al.*, 1999; WEN *et al.*, 2000) sind Wirkungen der Expression von p202, dem am besten charakterisierten HIN-200-Familienmitglied.

H-rev107 ist ein weiteres antiproliferativ wirkendes Protein, für das bisher nur eine Induktion durch Interferon- γ (KUCHINKE *et al.*, 1995), nicht aber durch IRF-1 beschrieben ist. H-rev107 wird wie IRF-1 ubiquitär, aber in nur geringem Maße exprimiert (SERS *et al.*, 1997; HUSMANN *et al.*, 1998). Es wurde bei der Suche nach potentiellen Tumorsuppressoren und deren Targetgenen entdeckt durch seine differentielle Expression in H-Ras-transformierten Zellen und sog. Revertanten, d. h. Zellen, die das Onkogen H-Ras noch exprimieren, aber einen nicht-transformierten Phänotyp zeigen (HAJNAL *et al.*, 1994). H-rev107 ist ein ca. 16-18 kDa großes Protein, das keine bekannten Struktur motive aufweist. Es ist mit der Zell- und Nukleus-Membran, sowie mit perinukleären Membranen assoziiert (SERS *et al.*, 1997). Seine genaue Funktion ist nicht bekannt, es wird aber vermutet, daß es durch Assoziation mit Signalmolekülen diese zu Membranen dirigiert, wo deren Aktivierung stattfinden kann. H-rev107 wirkt antiproliferativ auf transformierte Zellen (SERS *et al.*, 1997). Seine Expression ist in vielen Krebszelllinien, sowie in primären Tumoren herabreguliert, obwohl das Gen nicht mutiert ist. H-rev107 ist folglich als Tumorsuppressor der Klasse 2 charakterisiert worden (SERS *et al.*, 1997; HUSMANN *et al.*, 1998).

1.1.2.2. Tumorsuppressoraktivität von IRF-1

Auch tumorsuppressive Eigenschaften werden von IRF-1-aktivierten Genen vermittelt. Diese beruhen zum einen auf Wirkungen innerhalb der Zellen und führen insbesondere zum Absterben onkogen transformierter Zellen. Zum anderen stimuliert IRF-1 das Immunsystem, das daraufhin seinerseits Abwehrmechanismen gegen veränderte und maligne Zellen in Gang setzt (TANIGUCHI, 1997).

IRF-1-knock-out-Mäuse zeigen zwar keine erhöhte spontane Tumorraten (MATSUYAMA *et al.*, 1993), Mutationsstudien und Zellkulturexperimente machen aber dennoch die Rolle von

IRF-1 in der Verhinderung der Krebsentstehung deutlich. Embryonale Fibroblasten aus IRF-1-knock-out-Mäusen können schon durch ein einzelnes Onkogen (aktiviertes H-Ras) transformiert werden; entsprechende Wildtyp-Zellen benötigen zur Transformation hingegen mindestens zwei Onkogene. Während diese IRF-1 exprimierenden Wildtyp-Zellen durch H-Ras-Überexpression in Kombination mit Entzug von Serum, mit Zytostatika oder mit Bestrahlung in den programmierten Zelltod gehen, zeigen IRF-1-defiziente Zellen unter denselben Bedingungen keine Apoptose (TANAKA *et al.*, 1994).

Ein tumorsuppressiver Mechanismus besteht in der Unterdrückung von Zellteilung, wenn DNA-Schäden z. B. durch Bestrahlung aufgetreten sind. Dies gibt der entsprechenden Zelle Zeit, den genotoxischen Schaden zu reparieren, und verhindert so die Akkumulation von Mutationen. IRF-1 kooperiert in solchen Situationen mit p53. Während IRF-1 alleine keinen Zellzyklusstop bewirkt, führt die kombinierte Wirkung dieser beiden Tumorsuppressoren zu synergistischer Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 und zu einer Arretierung in der G1-Phase nach Behandlung mit γ -Strahlung oder dem Zytostatikum Adriamycin (TANAKA *et al.*, 1996).

Sind Zellen irreversibel geschädigt, setzt ein internes Selbstzerstörung-Programm ein, das einer Ausbreitung mutierter Zellen und damit der Tumorbildung vorbeugen soll. Die letzte Phase dieses programmierten Todes ist durch die Aktivierung und Funktion der Caspasen gekennzeichnet. Sie führen letztlich zur Fragmentierung der DNA und zum Selbstabbau der Zelle. Die Promotorregion des Caspase-Prototyps, Interleukin-1-beta-converting enzyme (ICE), enthält IRF-1-Bindungsstellen (CHIN *et al.*, 1997). IRF-1 kann also die Konzentration dieser Caspase erhöhen und damit die Voraussetzung zur Aktivierung derselben und zur Auslösung der Apoptose durch weitere Signale schaffen.

Tumorzellen sind durch ihre Fähigkeit zu unkontrolliertem Wachstum gekennzeichnet. Die Proliferation einer nicht-transformierten Zelle in einem Gewebe ist hingegen durch Signale und Kontakte mit den umliegenden Zellen reguliert. Lysyloxidase, ein durch IRF-1 induziertes Enzym, das zur Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix benötigt wird, trägt zur Prävention von Transformation und Adhäsions-unabhängigem Wachstum bei (TAN *et al.*, 1996).

Eine Gruppe von IRF-1-aktivierten Genen greift in die Regulation des Immunsystems ein. Dies geschieht zum einen durch Beeinflussung der Entwicklung und Funktion von Immunzellen und zwar sowohl von Zellen der adaptiven wie der angeborenen Immunantwort. Studien an knock-out-Mäusen belegen, daß sich unreife T-Zellen ohne IRF-1 zwar zu CD4⁺, nicht aber zu zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen entwickeln können. Durch die Regulation der

Interleukin-15-Expression kontrolliert IRF-1 zudem die Entwicklung einer weiteren Gruppe von Lymphozyten, darunter die Natürlichen Killer (NK)-Zellen (OHTEKI *et al.*, 1998). Die Aktivierung von NK- und CD8⁺-T-Zellen gehören auch zu den zugrundeliegenden Mechanismen der antiviralen Aktivität. Makrophagen benötigen für ihre Funktion in der Abwehr von Bakterien, Protozoen, aber auch in der Beseitigung von Tumorzellen das kurzlebige Gas Stickstoffmonoxid (NO). Die Produktion von NO wird durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) katalysiert, ein Enzym das durch IRF-1 induziert wird (KAMIJO *et al.*, 1994).

Zum anderen ist IRF-1 auch für die Erkennung potentieller Zielzellen einer Immunreaktion nötig. So ist eine vermehrte Anzahl von Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche, die zur Präsentation von Tumor- und Pathogenantigenen benötigt werden, eine Folge der IRF-1 Wirkung. Dies wird einerseits durch direkte Induktion dieser Gene (MIYAMOTO *et al.*, 1988), andererseits durch Induktion von Proteinen, die für die Prozessierung und den Transport von MHC Klasse I-Molekülen notwendig sind, bewirkt (HOBART *et al.*, 1996; WHITE *et al.*, 1996). Die daraus resultierende Verstärkung der Antigenpräsentation trägt zum besseren Erkennen und damit zur Eliminierung von Tumorzellen durch das körpereigene Immunsystem bei.

Über diese beschriebenen tumorsuppressiven Effekte hinaus kann IRF-1 spezifisch in onkogen transformierten Zellen Apoptose auslösen. Insbesondere ein Synergismus mit dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist beschrieben (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Da sich ein Teil dieser Arbeit speziell mit diesem Thema beschäftigt, werden der EGFR und seine Signalwege, sowie die Kooperation von IRF-1 und EGFR an späterer Stelle genauer beschrieben (Kapitel 1.2. und 1.3.).

1.1.3. Praktische Nutzung von IRF-1

Die Fähigkeit von IRF-1, das Zellwachstum zu verlangsamen bzw. anzuhalten, hat inzwischen Anwendung bei biotechnologischen Prozessen, insbesondere bei der technischen Produktion von Proteinen durch Säugerzellen in Fermentern, gefunden. Einige Ansätze nutzen zudem das Transaktivierungspotential von IRF-1, um die Produktionsmenge zu steigern (Kapitel 1.1.3.1.).

Die medizinische Anwendung ist noch nicht ganz soweit fortgeschritten. Steigerung der Expression oder der Aktivität von IRF-1 wird zur Zeit als potentielle Tumorthherapie diskutiert. Neuere Mausmodelle zeigen ermutigende Ergebnisse (Kapitel 1.1.3.2.).

1.1.3.1. Proliferationskontrolle in der Biotechnologie

Zelllinien, die zur Produktion rekombinanter Proteine verwendet werden, besitzen meist eine hohe Proliferationskapazität verbunden mit einer unbegrenzten Teilungsfähigkeit. In Fermenter- und anderen Kultivierungssystemen wachsen die Produzentenzellen folglich nicht nur bis zu einer für den Produktionsprozeß optimalen Dichte, sondern darüber hinaus. Dies führt zu Nährstoff- und Sauerstoffmangel, Akkumulation von Laktat und anderen, zum Teil toxischen Stoffwechselnebenprodukten und dadurch zum Absterben von Zellen. Infolge dieser Vorgänge sinkt die Produktqualität. Es treten proteolytische Spaltprodukte auf und Glykosylierungen werden nicht mehr korrekt an die Proteine gefügt werden. Ein weiteres Problem stellt das Verstopfen von Filtern in den Fermentern durch zu hohe Zelldichten dar.

Um diese Effekte zu vermeiden, ist es wünschenswert, das Zellwachstum zum Zeitpunkt der optimalen Zelldichte stoppen zu können, während der Protein-Produktionsprozeß weiter fortgesetzt wird. Unter Zuhilfenahme eines IRF-1-Konstruktes, das in seiner Aktivität gesteuert werden kann (siehe Kapitel 1.4.), konnten die für solche Prozesse relevanten BHK-Zellen in ihrem Wachstum reguliert werden (KIRCHHOFF *et al.*, 1996), was letztendlich eine kontinuierliche Fermentation ermöglichte (GESERICK *et al.*, 2000). Durch Verwendung eines Promotors mit IRF-1-Bindungsstellen, der das gewünschte Produktgen treibt, konnte die Produktionsmenge während der Wachstumshemmung sogar gesteigert werden (KIRCHHOFF *et al.*, 1996; GESERICK *et al.*, 2000).

Eine Notwendigkeit zur Proliferationskontrolle besteht auch in Mischkulturen, in denen sich verschiedene Zelltypen befinden. Falls diese ein unterschiedlich schnelles Wachstum aufweisen, kann ein Zelltyp den anderen im Laufe der Zeit überwachsen. Zur Kultivierung von Stammzellen werden beispielsweise oftmals Helferzellen benötigt. Diese schütten die für die Stammzellen notwendigen Cytokine aus und vermitteln durch Zell-Zell-Kontakte positive Signale, die die Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand halten (BREEMS *et al.*, 1998; BENNACEUR-GRISCELLI *et al.*, 1999). Man verwendet immortalisierte Helferzelllinien, da diese gegenüber primären Helferzellen eine größere Homogenität und eine bessere Handhabbarkeit aufweisen. Stammzellen teilen sich aber sehr langsam, während die Helferzelllinien meist hohe Wachstumsraten haben. Um das Problem des Überwachsens und eines hohen Nährstoffverbrauches zu vermeiden, ist es bisher üblich die Helferzellen vor der Kokultivierung zu bestrahlen und somit als Reaktion auf dadurch entstehende DNA-Schäden in ihrem Wachstum anzuhalten. Die Bestrahlung ist jedoch problematisch, da oftmals entweder ein Weiterwachsen oder ein Ablösen der Helferzellen von dem Kulturgefäß auftreten.

Ein Teil dieser Arbeit nutzt das wachstumshemmende Potential von IRF-1 zur Proliferationskontrolle in Stromazellen und untersucht, ob die zur Kokultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen notwendigen Eigenschaften in den so manipulierten Helferzellen erhalten bleiben.

1.1.3.2. Tumortherapeutisches Potential

Die Ausführungen in Kapitel 1.1.2.2. legen nahe, daß IRF-1 auch im Menschen als Tumorsuppressor wirkt und der Verlust seiner Aktivität bei der Entstehung von bestimmten Krebsarten des Menschen eine Rolle spielt. Das humane IRF-1 Gen liegt auf Chromosom 5q31.1. Tatsächlich korrelieren Deletionen dieser Region und Inaktivierung des IRF-1 Gens in einem oder beiden Allelen mit dem Auftreten von Leukämien und präleukemischen myelodysplastischen Syndromen (MDS) (WILLMAN *et al.*, 1993; BOULTWOOD *et al.*, 1993; HARADA *et al.*, 1994). Zudem wurde der Verlust des IRF-1-Genes mit der Entstehung von Magenkrebs in Verbindung gebracht (TAMURA *et al.*, 1996; NOZAWA *et al.*, 1998).

Interferone werden schon seit einiger Zeit in der Therapie verschiedener humaner Krebsarten eingesetzt. So wird Interferon-alpha derzeit als Therapeutikum der Wahl für viele Leukämien angesehen (QUESADA, 1987; BRITTINGER *et al.*, 1997). Auch bei der Behandlung von Melanomen, Nierenkarzinomen und Darmkarzinoiden wird Interferon verabreicht (JONASCH und HALUSKA, 2001). Interferon-beta wird zudem hauptsächlich bei der Bekämpfung von Multipler Sklerose, einer Autoimmunerkrankung, eingesetzt (KARP *et al.*, 2000). Die Mechanismen, über die Interferone zum Anhalten oder zum Zurückgehen des Tumorwachstums bzw. zur Milderung der Multiplen Sklerose beitragen, sind allerdings weitgehend unklar. Aufgrund seiner tumorsuppressiven und immunmodulatorischen Eigenschaften (Kapitel 1.1.2.1 und 1.1.2.2.) scheint es wahrscheinlich, daß das von Interferonen induzierte IRF-1 hierbei eine wichtige Rolle spielt. Da die Interferon-Behandlung aufgrund einer Reihe unerwünschter Nebeneffekte problematisch ist (JONASCH und HALUSKA, 2001), scheint es vielversprechend, statt dessen direkt die Expression oder die Aktivität von IRF-1 zu erhöhen. Dies könnte durch eine geeignete Kombination von Cytokinen oder durch einen anderen Wirkstoff geschehen. Die Suche nach solchen Aktivatoren wird zur Zeit betrieben.

Gleichzeitig wurden Tiermodelle entwickelt, die das tumortherapeutische Potential von IRF-1 belegen. Transformierte, syngene Zellen können nach Transplantation in Mäuse Tumore bilden. Sarkomzelllinien sowie Leberkrebszelllinien verlieren diese Fähigkeit nach Induktion von exogenem IRF-1. Sowohl antiproliferative, transformationssuppressive wie

auch immunologische Mechanismen scheinen zugrunde zu liegen (YIM *et al.*, 1997; KRÖGER *et al.*, 2001).

Wichtig für die Evaluierung von IRF-1 für die Verwendung in der Tumorthherapie sind deshalb die seiner Wirkung zugrunde liegenden Mechanismen, nicht zuletzt seine Interaktion mit onkogenen Signalen in Tumorzellen.

Als Modellsystem wurde in dieser Arbeit das Zusammenspiel von IRF-1 und Signalen des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in der Apoptoseauslösung betrachtet. EGFR ist ein klinisch relevantes Protoonkogen, daß vielfältige Signalwege einschaltet. Er soll zunächst in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden.

1.2. Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

1.2.1. Die Human Epidermal Growth Factor-like Receptor (HER)-Familie

Vier Rezeptor-Tyrosin-Kinasen werden unter der Familie der Human Epidermal Growth Factor-like Receptors (HER1 bis HER4) zusammengefaßt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Embryogenese und sind an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung im erwachsenen Organismus beteiligt (OLAYIOLEYE *et al.*, 2000). Die Deregulation des HER-Signalnetzwerkes ist ein signifikanter Faktor bei der Entstehung oder Progression verschiedener menschlicher Krebsarten, wie Neoplasien des Gehirns, der Lunge, der Brust, der Eierstöcke und der Prostata (SALOMON *et al.*, 1995). Deregulation von HERs wird sogar als wichtigster Zelloberflächenmarker in der Diagnose von humanem Krebs gesehen (COHEN *et al.*, 1998).

Cytokine wie z. B. Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor alpha (TGF- α) oder Neureguline können an die extrazellulären Bereiche dieser Rezeptoren binden. Dimerisierung und Autophosphorylierung mehrerer Tyrosine im intrazellulären Bereich (Abbildung 3) ermöglichen daraufhin den Rezeptoren das Weiterleiten des Signals ins Innere der Zelle (OLAYIOLEYE *et al.*, 2000). Nicht nur homodimere Rezeptorkomplexe sind dabei funktionell; auch verschiedene Heterodimere werden je nach Konzentration der einzelnen HERs, dem Liganden und einer gewissen intrinsischen Affinität der Rezeptoren untereinander gebildet (GULLICK, 1998).

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), wie HER1 im weiteren bezeichnet werden wird, wird in nahezu allen Geweben, mit der Ausnahme von hämatopoetischen Geweben und

des Skelettmuskels, exprimiert. EGFR-knock-out-Mäuse sterben im Embryonalstadium und weisen schwere Defekte in verschiedenen Organen wie dem Gehirn, der Haut, der Lunge und dem Magen-Darm-Trakt auf (MIETTINEN *et al.*, 1995). Die Aktivierung des Epidermal Growth Factor Receptors durch seinen Liganden EGF kontrolliert und stimuliert die Proliferation epidermaler und epithelialer Zellen. Sie kann außerdem zur Transformation von Zellen führen.

EGF bindet spezifisch an den EGFR. Es ist ein Protein von 53 Aminosäuren Länge, das in fast allen Körperflüssigkeiten in Konzentrationen zwischen 1-100 ng/ml vorkommt. Produziert wird es von Zellen verschiedener Organe, u. a. der Niere und dem Gehirn (IBELGAUFTS, 1995).

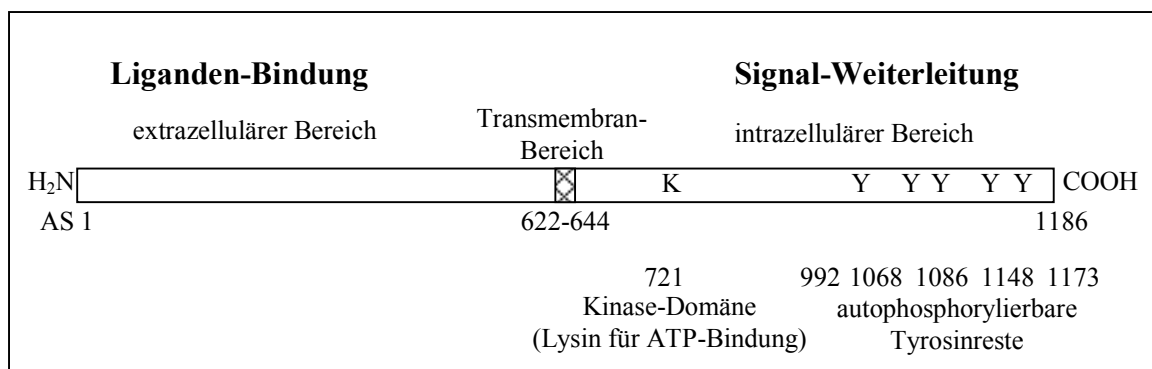


Abb. 3: Aufbau des EGFRs

1.2.2. EGFR-vermittelte Signalwege

Aktivierung des EGFRs durch Ligandenbindung führt zur Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle, die über ihre Src-Homology 2 (SH2)-Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste des EGFRs binden können. Mehrere Signalwege werden dadurch angeschaltet. Die Hauptwege sind der Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase-Signalweg, der Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Weg und der Phospholipase C/ Proteinkinase C (PLC/PKC)-Signalweg (Abbildung 5).

1.2.2.1. Der Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg

STAT-Proteine vermitteln die biologische Wirkung vieler Cytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone und sind somit an Prozessen wie der Embryonalentwicklung, dem programmierten Zelltod, angeborenen und adaptiven Immunantworten und der Zellwachstumsregulation beteiligt (HORVATH, 2000). Unter anderen bedienen sich auch

Interferone dieses Signalweges, indem sie mittels Janus-Kinasen (JAKs) STAT-Proteine aktivieren. Von den sieben bekannten STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) aktiviert der EGFR die Isoformen STAT1, STAT3 und die beiden STAT5-Varianten (SHUAL *et al.*, 1993; ZHONG *et al.*, 1994, RUFF-JAMISON *et al.*, 1995). Unklar ist, ob die Tyrosin-Phosphorylierung der STATs direkt durch den EGFR erfolgt oder ob die Src-Kinase zunächst vom EGFR phosphoryliert wird und dann wiederum die STATs phosphoryliert (OLAYIOYE *et al.*, 1999). Aktive STAT-Dimere bilden sich durch reziproke Wechselwirkung der SH2-Domäne des einen mit dem phosphorylierten Tyrosinrest des anderen Monomers (Abbildung 4). Neben homodimeren Paarungen, sind auch STAT1/STAT3- und STAT5a/STAT5b-, nicht aber STAT1/STAT5- oder STAT3/STAT5-Heterodimere nach Wachstumsfaktor-Stimulation beschrieben (SCHULZE *et al.*, 2000). Die Dimere translozieren in den Nukleus, erkennen dort spezifische DNA-Elemente und aktivieren die Transkription. Die STAT-Moleküle werden hiernach durch Dephosphorylierung inaktiviert und kehren ins Cytoplasma zurück. Konkurrenz um Bindungsstellen an Rezeptortyrosinkinasen durch Suppressors of Cytokine Signaling (SOCSs) sind ein weiterer Mechanismus zum Abschalten der STAT-Aktivierung, da die Transkription der SOCSs durch STATs aktiviert wird (STARR *et al.*, 1997).

Neben der transkriptionsaktivierenden Wirkung der STATs, sind auch wenige Fälle bekannt, in denen STAT1 reprimierend auf Promotoren wirkt (RAMANA *et al.*, 2000b). Als Ursache wird entweder eine Konkurrenz mit anderen Transkriptionsfaktoren um Koaktivatoren oder eine gemeinsame Bindung von STAT1 und einem inhibitorischen Transkriptionsfaktor in benachbarten Bereichen auf der DNA vermutet (RAMANA *et al.*, 2000a).

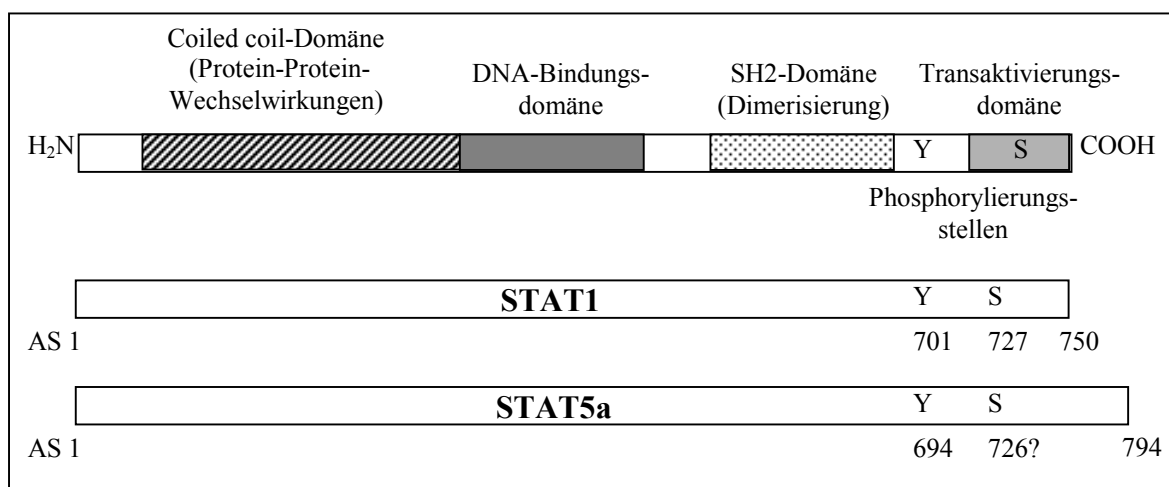


Abb. 4: Aufbau der STAT-Proteine

1.2.2.2. Der Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase-Signalweg

Neben dem STAT-Signalweg ist der MAP-Kinase-Weg bedeutend für die Vermittlung der EGF-Wirkung (Abbildung 5). Der aktivierte EGFR bindet und phosphoryliert zunächst das Adapterprotein Shc (Src-homology collagen), welches wiederum einen Komplex aus Grb2 (Growth factor receptor-binding protein) und Sos1 (dem Säugetier-Homolog zu dem *Drosophila*-Protein Son of Sevenless) rekrutiert. Sos1 kann daraufhin Ras durch den Austausch von GDP gegen GTP aktivieren. Unter „Ras“ werden die Produkte der drei Gene H-ras, K-ras und N-ras zusammengefaßt. Raf, eine Serin-Threonin-Kinase, wird durch Ras aktiviert und phosphoryliert ihrerseits die Mitogen-activated ERK-Kinases MEK1 und MEK2 (DENT *et al.*, 1992). MEK1/2 phosphorylieren dann die Extracellular signal-Regulated Kinases ERK1 und ERK2 (WU *et al.*, 1993). ERK1/2 sind MAP-Kinasen. Parallel dazu aktiviert der EGFR auch MEK5 und infolge dessen ERK5 (KATO *et al.*, 1998). Nach ihrer Aktivierung translozieren die ERKs in den Nukleus und phosphorylieren dort verschiedene Transkriptionsfaktoren.

Die Familie der MAP-Kinasen umfaßt drei Subgruppen. Außer den ERKs gehören auch die c-Jun NH2-terminal protein Kinases (JNKs) und die p38 Proteinkinase dazu (XIA *et al.*, 1995). MAP-Kinasen vermitteln die zelluläre Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli und werden nicht nur durch Wachstumsfaktoren, sondern auch durch UV-Licht, Hitzeschock und andere Arten von Stress, sowie durch Cytokine und Phorbolester aktiviert.

Das Abschalten des MAP-Kinase-Signalweges kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Z. B. werden MAPK-Phosphatasen (MKPs) durch Wachstumsfaktoren und Phorbolester induziert. Sie inaktivieren MAP-Kinasen durch Dephosphorylierung sowohl an Threonin als auch an Tyrosin (SUN *et al.*, 1993).

1.2.2.3. Der Phospholipase C/Proteinkinase C (PLC/PKC)-Signalweg

Eine Anzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern bedient sich des Phospholipase C/Proteinkinase C (PLC/PKC)-Signalweges zur Realisierung ihrer biologischen Aktivitäten wie z. B. der Genexpression, Proliferation oder der Muskelkontraktion (TOULLEC *et al.*, 1991). EGFR rekrutiert und aktiviert nach EGF-Stimulation Phospholipase C. Die Hydrolyse von Phosphoinositolen durch PLC generiert zwei Botenstoffe: Inositol-1,4,5-triphosphat, das Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisiert, und Diacylglycerol (DAG). Ca^{2+} und DAG führen zur Aktivierung von einigen Isoformen der Proteinkinase C.

Die PKC-Familie umfaßt elf Serin-Threonin Proteinkinasen und wird unterteilt in drei Untergruppen. Die klassischen Isoformen (α , $\beta 1$, $\beta 2$ und γ) benötigen Ca^{2+} und DAG für ihre Funktion. Lediglich von DAG sind die Mitglieder der neuen PKCs (δ , ϵ , η , μ und θ) abhängig. Atypische Isoformen (λ und ζ) hingegen sind Ca^{2+} - und DAG-unabhängig. Klassische und neue Isoformen können auch durch Phorbolester, die als Surrogat für DAG dienen, aktiviert werden, atypische hingegen nicht (STABEL, 1994). Welche Isotypen aktiviert werden hängt zudem von einigen Kofaktoren ab und ist je nach Zelltyp unterschiedlich (LIU und HECKMAN, 1998).

Die aktivierten PKCs phosphorylieren ihre Zielproteine an Serin- und Threoninresten. Wie PKCs genau an der Regulation von Zell-Transformation, -Wachstum und -Differenzierung teilnehmen ist allerdings weitgehend unbekannt (LIU und HECKMAN, 1998).

1.2.2.4. Interaktionen zwischen EGFR-Signalwegen

Seit einiger Zeit wird deutlich, daß die verschiedenen Antworten auf extrazelluläre Stimuli durch ein intrazelluläres Netzwerk von kombinatorischen Interaktionen einer begrenzten Anzahl von Signalmolekülen vermittelt wird (PAWSON und SAXTON, 1999). Folglich wurden Verknüpfungen von Signalwegen entdeckt, die zuvor als linear angesehen wurden. Auch für die EGFR-Signalwege sind einige Querverbindungen beschrieben.

α PKC und ϵ nPKC aktivieren Raf durch Serin-Phosphorylierung und münden somit in den MAP-Kinase-Signalweg (CAI *et al.*, 1997). Desweiteren liegt Serin 727 von STAT1, dessen Phosphorylierung für die maximale transkriptionelle Aktivität nach Cytokinstimulation notwendig ist, in einer MAPK-Konsensussequenz (WEN *et al.*, 1995). Die p38-MAPK wurde mit der STAT1-Serin-Phosphorylierung in Verbindung gebracht (GOH *et al.*, 1999). Zudem sind physische Assoziationen von STAT1 und STAT5 mit ERKs beschrieben (DAVID *et al.*, 1995; PIRCHER *et al.*, 1999). Ein Einfluß von STATs auf den MAPK-Signalweg im Kontext der EGFR-Aktivierung ist bisher nicht bekannt. Allerdings scheint die Interferon- γ und Oncostatin M-vermittelte Raf-1-Aktivierung von Tyrosin-phosphorylierbarem STAT1 abhängig zu sein (STANCATO *et al.*, 1998).

Demnach bedient sich der EGFR mehr eines Netzwerkes von Interaktionen als linearer Signalwege zur Vermittlung seiner Botschaft. Es ist zudem noch zu bedenken, daß sich je nach Vorgeschichte, Zelltyp und Differenzierungsstatus ein unterschiedliches Repertoire an Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren in der Zelle befindet. Diese können mit den auf ein Signal hin gebildeten Faktoren interagieren und so zur Aktivierung verschiedener Promotoren führen. Der gleiche Stimulus kann also zu unterschiedenen Reaktionen führen, je nachdem

welche Zelle ihn erhält (PAWSON und SAXTON, 1999). Die Integration multipler, auf eine Zelle einwirkender Signale kann deshalb zu unerwarteten Ergebnissen führen.

1.3. Kooperation von IRF-1 und EGFR in der Apoptoseinduktion

Während der Tumorsuppressor IRF-1 lediglich einen verlangsamen Effekt auf das Wachstum einer Zelle hat und EGFR die Proliferation steigert, führt die gleichzeitige Aktivierung dieser beiden Faktoren nicht etwa zu einem gegenseitigen Aufheben der Effekte. Vielmehr induziert die Kombination von IRF-1 und EGFR Zelltod (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999).

Apoptose, programmierter Zelltod, wird durch eine Reihe morphologischer und biochemischer Kriterien von Nekrose unterschieden. Aktivierung von Caspasen, definierter Abbau der DNA in Oligonukleotide und eine Fragmentierung der Zelle sind typische Anzeichen für das Endstadium der Apoptose. Zudem treten Störungen der Membranasymmetrie auf, d. h. Phosphatidylserinreste, befinden sich nun nicht nur auf der cytoplasmatischen Seite, sondern auch auf der extrazellulären Seite der Membran. Die Membranintegrität bleibt dabei erhalten. Eine strikte Trennung zwischen Apoptose und Nekrose ist allerdings nicht immer gegeben. Die häufig auftretenden Mischformen werden neuerdings unter dem Begriff „Paraptosis“ gefaßt (SPERANDIO *et al.*, 2000).

Kombinierte IRF-1/EGFR-Aktivierung führt innerhalb von drei Tagen zum Absterben der Zellen und ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl von Zellen, auf deren Oberfläche trotz intakter Membranen Phosphatidylserinreste (PS) nachgewiesen werden können. Konkret sind 23% der Zellen nach zwei Tagen IRF-1/EGFR-Aktivierung PS-positiv gegenüber 0% der Zellen in den unbehandelten bzw. einzeln behandelten Kontrollen. Zudem konnte eine Fragmentierung der DNA in Oligonukleotide nachgewiesen werden. Folglich wurde der IRF-1/EGFR-vermittelte Zelltod als Apoptose charakterisiert (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999).

Es stellt sich nun die Frage nach der Art und Ebene des Zusammenspiels der Signale, die durch IRF-1 und EGF ausgelöst werden. Insbesondere ist die Identifizierung der EGFR-Signalwege, die an der Apoptoseinduktion beteiligt sind, von Interesse im Hinblick auf die Entwicklung einer Tumorthherapie durch IRF-1. Der STAT-Signalweg scheint bei der Interaktion mit IRF-1 eine wichtige Rolle zu spielen, da die Expression einer dominant-negativen STAT5-Variante die Apoptose nach IRF-1/EGFR-Aktivierung verhindert. Eine dominant-negative Variante von Ras ist hierzu hingegen nicht fähig (KIRCHHOFF und HAUSER,

1999). Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich aufbauend auf diesen Ergebnissen näher mit den für die Apoptoseauslösung notwendigen EGFR-Signalwegen.

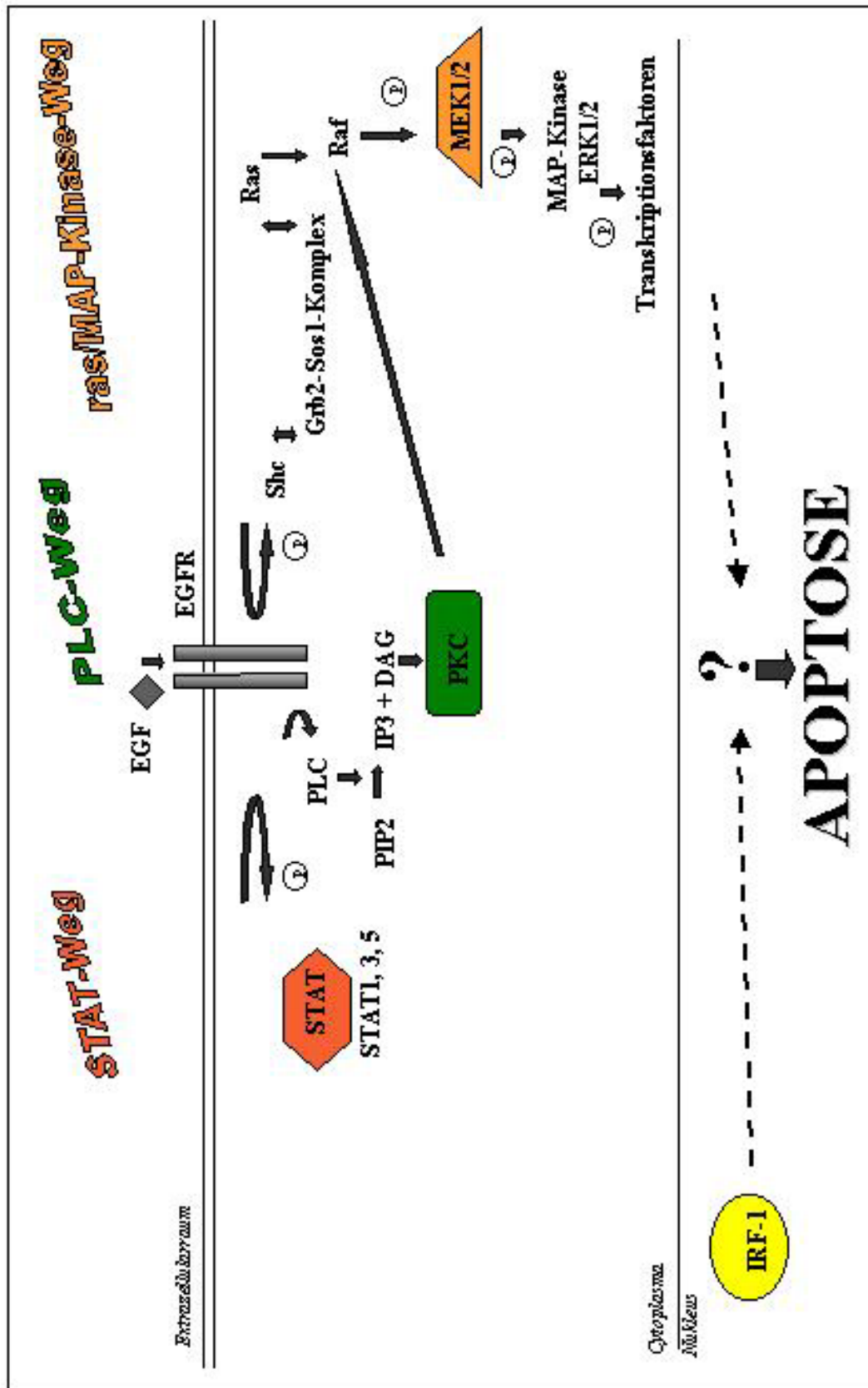


Abb. 5: EGFR-Signalwege und Apoptoseinduktion in Kooperation mit IRF-1

1.4. Ausgangsbasis und Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit drei Teilgebieten:

1. Entwicklung eines Selektionssystems für hochexprimierende Zellen am Beispiel von IRF-1

Die stabile Überexpression von IRF-1 in eukaryontischen Zellen ist aufgrund seiner konstitutiven Aktivität und seinen wachstumshemmenden Eigenschaften nur sehr schwer möglich. Deshalb wurde ein Fusionsprotein entwickelt, bei dem der Hormon-bindenden Teil des humanen Östrogenrezeptors (hER) Carboxy-terminal an das murine IRF-1 gekoppelt ist (Abbildung 6). Bindung von in der Zelle vorhandenen Hitzeschockproteinen an hER verhindert, daß IRF-1 transkriptionsaktivierend wirken kann. Gibt man Östrogen ins Medium, so dringt dieses ins Innere der Zelle, bindet an hER und hebt dessen negativen Effekt auf IRF-1 auf. IRF-1 kann daraufhin seine Wirkung entfalten. Die Stärke der durch IRF-1-vermittelten Wachstumsinhibition korreliert mit der Östrogenkonzentration im Medium (KIRCHHOFF *et al.*, 1993). Das IRF-1-hER Fusionsprotein läßt sich stabil überexprimieren. Die Expression ist allerdings generell niedrig und in Klonmischungen oftmals instabil. Dies könnte auf eine Restaktivität von IRF-1 im uninduzierten Zustand oder auf eine nicht vermeidbare Anwesenheit von geringen Östrogenmengen im Serum des Zellkulturmediums zurückzuführen sein.

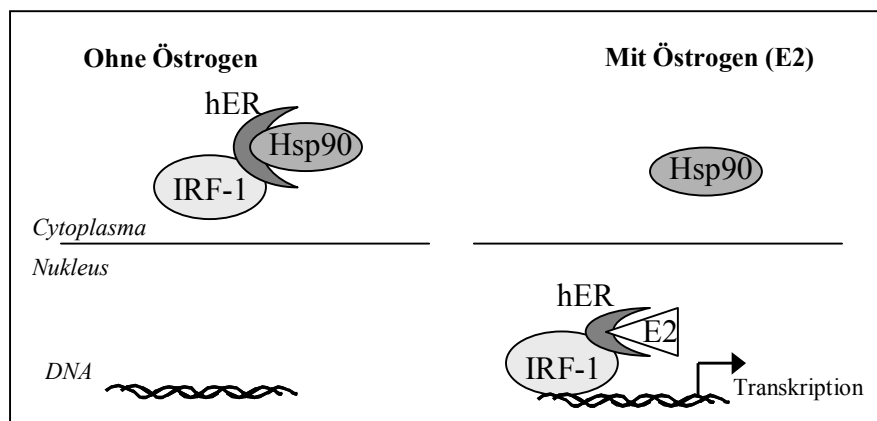


Abb. 6: Das IRF-1-hER Fusionsprotein

Aufbauend auf diesem Konstrukt sollte nun ein System entwickelt werden, daß eine Selektion auf hochexprimierende Zellen erlaubt und die Expression in der Langzeitkultur stabilisiert.

2. Anwendung des proliferationsinhibitorischen Potentials von IRF-1 zur Regulation des Wachstums von Helferzellen bei der Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen

Die Kultivierung, Manipulation und Re-Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist ein essentieller Bestandteil einiger Leukämie-Therapien. Um die Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten, werden sie häufig mit Stromazellen aus dem Knochenmark kokultiviert. Die Bestrahlung der Helferzellen vor der Kokultivierung zum Zweck der Wachstumsarretierung ist bei murinen Stromazellinien relativ unproblematisch. Die Bestrahlungsdosis für menschliche Stromazellinien ist hingegen heikel, da oftmals ein Weiterwachsen oder ein Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß beobachtet wird. Andererseits erfordert die klinische Anwendung die Verwendung menschlicher Helferzellen.

Eine IRF-1-gesteuerte Wachstumsregulation sollte in der humanen Stromazelllinie L88/5 (THALMEIER *et al.*, 1994) etabliert werden.

3. Untersuchung der Signaltransduktion in der IRF-1/EGFR-vermittelten Apoptose

Frühe Schritte in der Signaltransduktion, die zu Apoptose durch Kooperation von IRF-1 mit onkogenen Signalen führen, sollten in einem dritten Teilprojekt untersucht werden. Im Laufe der Arbeit wurde der Fokus dabei auf die Signalwege des EGFRs gelegt. Das System, in dem die meisten Untersuchungen dazu gemacht wurden, sind NIH3T3-Zellen, die den humanen EGFR und das IRF-1-hER-Fusionsprotein stabil überexprimieren. Hier kann IRF-1 durch Zugabe von Östrogen und der EGFR durch Zugabe von EGF in das Medium aktiviert werden (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999).

II. Ergebnisse

2.1. Die Entwicklung eines Selektionssystems für hochexprimierende Zellen am Beispiel von IRF-1

Die genetische Modifikation von Zellen zum Zweck der Expression von rekombinanten Proteinen erfordert den gleichzeitigen Transfer des zu exprimierenden Gens mit einem Resistenzmarker. Die Höhe der Resistenzgenexpression korreliert beim Kotransfer zweier einzelner Plasmide allerdings nicht unbedingt mit der Höhe der Expression des interessierenden Gens. Deshalb ist die Isolierung stabiler, hochexprimierender Säugetierzellen ein zeitaufwendiger Prozeß, der die Kultivierung und das Testen vieler Zellklone erfordert.

Die Expression von IRF-1 ist im Besonderen schwierig, da dieses Protein einen negativen Effekt auf die Proliferation von Zellen ausübt. IRF-1-exprimierende Zellen haben also einen Selektionsnachteil. Selbst innerhalb einer Zellpopulation, die sich von einem einzelnen Klon ableitet, kann eine genetische Drift im Laufe der Zeit stattfinden, so daß Zellen spontan die Expression des gewünschten Gens reduzieren oder abschalten, dabei allerdings noch resistent gegenüber der Selektionsdroge bleiben. Diese Zellen können dann aufgrund einer stärkeren Proliferation die IRF-1-exprimierenden Zellen überwachsen. Deshalb ist die Expression in einer solchen Population längerfristig instabil.

Es wurden zwei Ansätze verfolgt, um die Selektion hochexprimierender IRF-1-hER-Klone zu erleichtern.

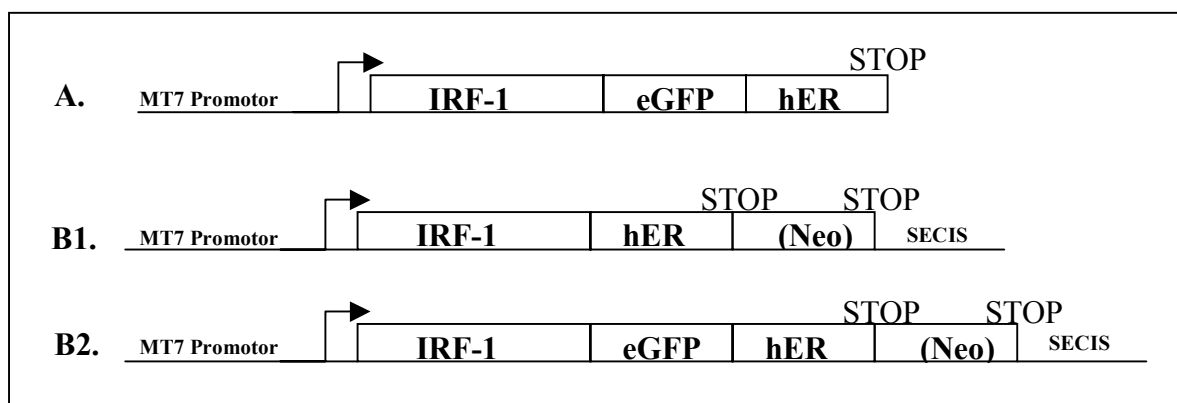


Abb. 7: Die IRF-1-hER-Expressionskonstrukte. (A) pIRF-GFP-hER. (B1) pIRF-1-hERneo. (B2) pIRF-GFP-hERneo.

2.1.1. Die Fusion von IRF-1-hER und enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) zum Expressionsmonitoring

In einem ersten Ansatz wurde das enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) zwischen IRF-1 und den Östrogenrezeptorteil integriert (Abbildung 7A). eGFP kann durch Licht von 488 nm Wellenlänge angeregt werden und emittiert im Bereich von 507 nm (KENDALL und BADMINTON, 1998). Zellen, die eGFP exprimieren, können also in der Fluoreszenzmikroskopie durch ihr grünes Leuchten leicht von nicht-exprimierenden Zellen unterschieden werden. Zudem ist eine Trennung nach Exprimierern und Nicht-Exprimierern, sowie nach Expressionshöhe durch FACS-Sortierung möglich.

Beim Design von Fusionsproteinen besteht eine Schwierigkeit darin, daß die Funktion einzelner Teile durch die Einbindung in das Gesamtprotein behindert werden kann. Insbesondere könnte die Kontrolle der IRF-1-Aktivität durch eine räumliche Trennung vom Hormon-bindenden Teil des Östrogenrezeptors verloren gegangen sein. Eine transiente Transfektion zeigte jedoch, daß das IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein ebenso wie IRF-1-hER in seiner Fähigkeit, an IRF-1-Bindungsstellen in Promotoren zu binden und Transkription zu aktivieren, durch Östrogen reguliert werden kann (Abbildung 8). Die Hintergrundaktivität, die in Abwesenheit von Östrogenstimulation gemessen werden kann, war im Falle des eGFP-Fusionsproteins etwas erhöht. Desweiteren könnte die Funktion des eGFPs durch den Gesamtproteinkontext zerstört worden sein. Auch dies trifft nicht zu. Das Fusionsprotein konnte im Fluoreszenzmikroskop in Zellen sichtbar gemacht werden (Abbildung 9). Die Abbildung zeigt, daß IRF-1-eGFP-hER sich im uninduzierten Zustand hauptsächlich im Cytoplasma befindet. Eine Translokation des Proteins in den Nukleus nach Östrogenstimulation wurde beobachtet.

Auch im FACS konnte das Fusionsprotein gut detektieren werden (Abbildung 10). Eine stabile Transfektion von pIRF-GFP-hER zusammen mit einem Neomycin-Resistenzkodierenden Plasmid in BHK21-Zellen führte nach der Selektion zu einem kontinuierlichen Spektrum an Zellen unterschiedlicher Fluoreszenzhöhe. 44% der Zellen zeigten dabei niedrige oder nicht über dem Hintergrund liegende Fluoreszenzemissionen. Die Intensität der Fluoreszenz sollte proportional zur eGFP-Expression sein. Da es sich ja um ein Fusionsprotein handelt, sollte diese wiederum direkt mit der IRF-1-Aktivität korrelieren. Eine Selektion nach Zellen beliebiger IRF-1-Expressionshöhe (z. B. im Fenster R3 in Abbildung 10) ist deshalb leicht möglich.

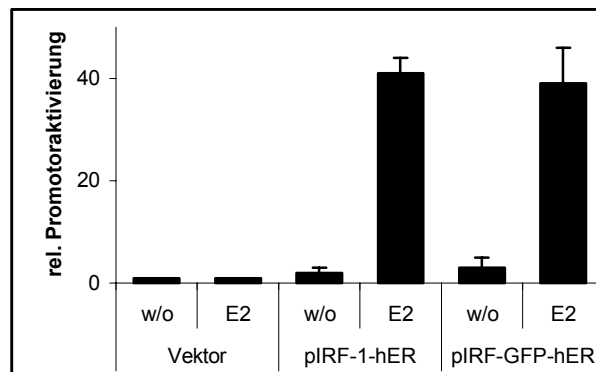


Abb. 8: Die IRF-1-Aktivität im IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein ist durch Östrogen regulierbar. Der Reporter pGL2-CVX-ISREII kann durch die Bindung von IRF-1 induziert werden. Er wurde zusammen mit dem Plasmid pMPSVHEcat und den angegebenen Expressionsplasmiden transient in NIH3T3-Zellen transfiziert. pMPSVHEcat vermittelt eine konstitutive Expression des CAT-Genes. Es dient als Maß für die Transfektionseffizienz in verschiedenen Proben. Unstimulierte (w/o) und Östrogen-stimulierte (E2) Ansätze wurden verglichen. Die relative Promotoraktivierung ergibt sich aus dem Quotienten von Luciferaseaktivität und CAT-Protein-Menge. Sie wurde für die unstimulierte Vektor-Kontrolle auf 1 gesetzt und es wurden die weiteren Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

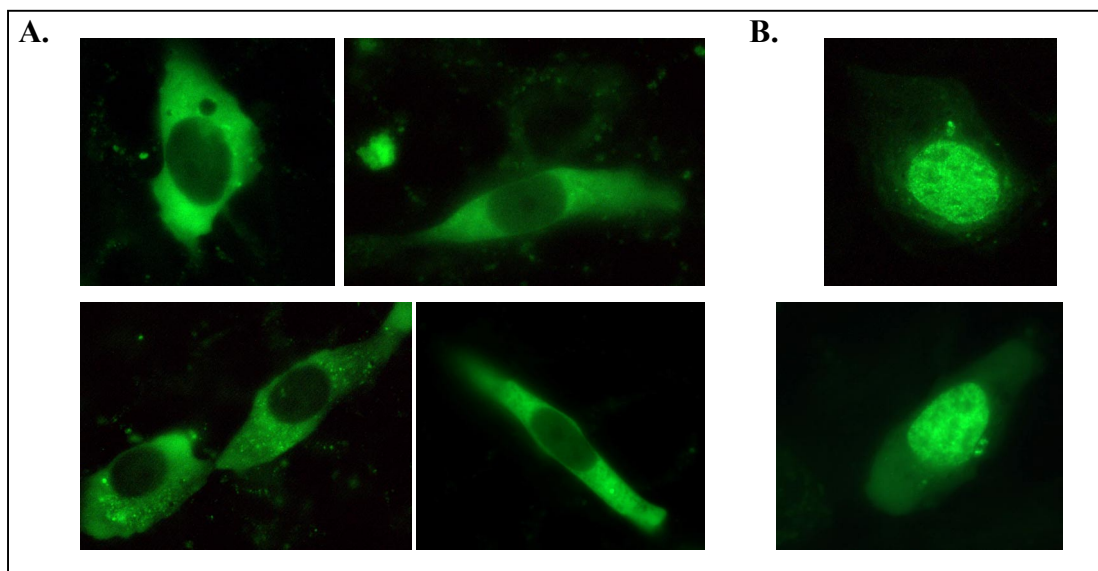


Abb. 9: Das IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein ist durch Fluoreszenzmikroskopie detektierbar. pIRF-GFP-hER wurde transient in KA1-10/96-1A-Zellen transfiziert. **(A)** Die linken vier Bilder zeigen, daß sich das IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein im inaktiven Zustand hauptsächlich im Cytoplasma befindet. **(B)** Nach 24 h Östrogen-Stimulation ist der Großteil des Fusionsproteins im Zellkern lokalisiert wie die beiden Bilder auf der rechten Seite zeigen.

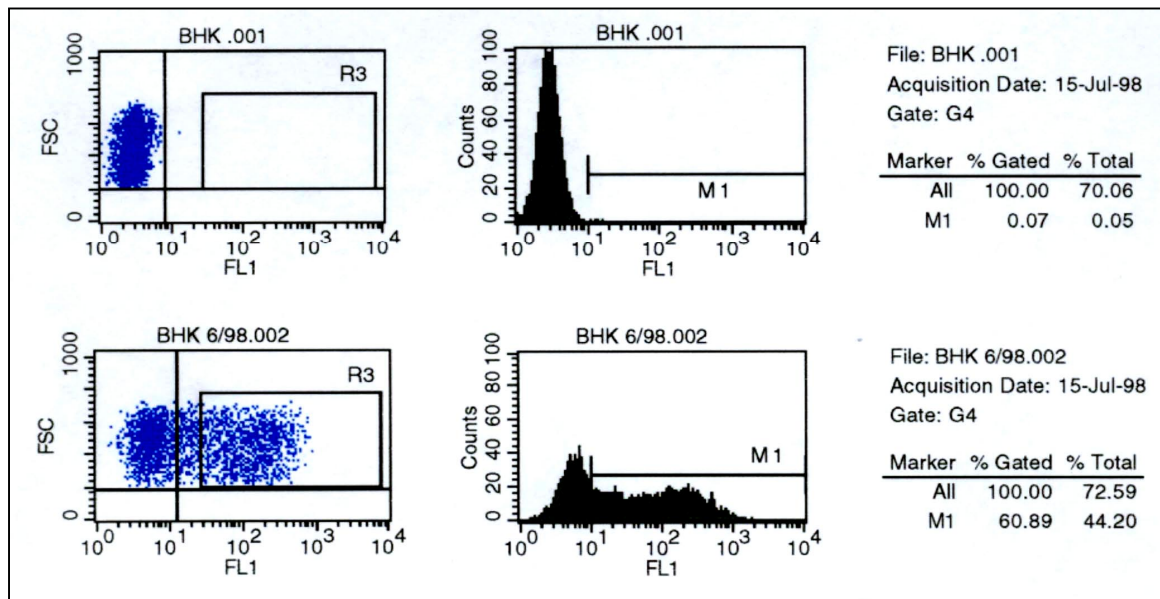


Abb. 10: Nachweis von IRF-1-eGFP-hER durch FACS-Analyse. Untransfizierte (obere Reihe) und stabil mit pIRF-GFP-hER transfizierte (untere Reihe) BHK21-Zellen wurden durch FACS-Analyse verglichen. Die x-Achse (FL1) misst die Fluoreszenzintensität.

2.1.2. Die IRF-1-hER-Neomycinphosphotransferase-Fusion zur Expressionsstabilisierung und als Selektionssystem für hochexprimierende Zellklone

Die Kopplung der Expressionshöhe des Selektionsmarkers und des interessierenden Genes ist beim Kotreansfer zweier verschiedener Plasmide nicht notwendigerweise gegeben. Bei bisherigen Versuchen, dieses Problem zu umgehen, wurden deshalb beide Gene durch ein einzelnes Plasmid exprimiert. Dies kann z. B. durch verschiedene Promotoren oder bicistronisch mittels eines Internal Ribosomal Entry Site (IRES)-Elementes erfolgen. Aber auch hier treten Schwierigkeiten bei der Selektion auf hochexprimierende Zellen auf. Brüche in der Plasmid-DNA während der Transfektion führen oftmals zur Integration von Plasmid-Fragmenten an mehreren Stellen der Wirt-DNA. Integriert ein Fragment, welches das Resistenzgen kodiert unabhängig, so ist seine Expression durch seinen chromosomalen Kontext anders geregelt als die des interessierenden Genes.

In einem zweiten Ansatz wurde nun versucht, die Expression des Resistenzmarkergens möglichst eng an die von IRF-1-hER zu koppeln. Das Neomycin-Resistenzgen wurde unter Entfernung seines ATG-Startkodons 3' an die das IRF-1-hER- bzw. das IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein kodierende Sequenz kloniert. Als Stopkodon für die IRF-1-Fusionsproteine wurde TGA gewählt. Hinter das Neomycinresistenzgen wurde zudem ein Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS)-Element gesetzt (Abbildung 7B1 und 7B2). In 99,7% der Fälle sollte die Translation der mRNA, die von diesen Vektoren transkribiert wird, beim ersten

Stopkodon beendet werden und das IRF-1-hER- bzw. das IRF-1-eGFP-hER-Protein entstehen. In 0,3% der Fälle allerdings sollte das UGA-Stopkodon durch die Wirkung des SECIS-Elements überlesen werden (KOLLMUS *et al.*, 1996). Dann ergibt sich ein Fusionsprotein aus IRF-1-hER bzw. IRF-1-GFP-hER und der Neomycinphosphotransferase.

Zunächst wurde die Funktionalität der durch diese neuen Plasmide kodierten Bestandteile geprüft. Von pMT7-IRF-1-hER und pIRF-1-hERneo werden unterschiedlich lange RNAs transkribiert. Dies könnte zu unterschiedlich langen RNA-Halbwertszeiten und damit trotz identischer Promotoren zu unterschiedlichen Expressionshöhen des IRF-1-hER-Proteins führen. In einem transienten Transfektionsexperiment zeigten beide Konstrukte allerdings eine vergleichbar hohe Aktivierung eines IRF-1-responsiven Promotors (Abbildung 11), so daß eine mögliche Veränderung der RNA-Stabilität in diesem Falle vernachlässigbar scheint. Es wird erwartet, daß nur ein Promillesatz der Translationsprodukte von pIRF-1-hERneo und pIRF-1-GFP-hERneo zu einem Neomycinphosphotransferase-Fusionsprotein führt. Es stellt sich die Frage, ob diese Resistenzmarker-Fusionsproteine Neomycinresistenz vermitteln können und, wenn ja, ob die niedrige Expression ausreicht, um diese Funktion zu vermitteln. BHK21-, 2fTGH- und NIH3T3-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und mit G418, einem Neomycin-Analogon, selektiert. Von allen drei Linien konnten G418-resistente Zellklone erhalten werden.

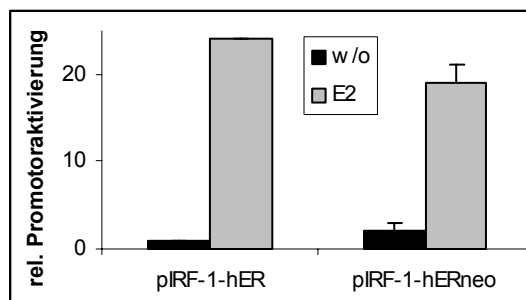


Abb. 11: Vergleich der Promotoraktivierung durch transiente Transfektion der Plasmide pMT7-IRF-1-hER und pIRF-1-hERneo. Der Reporter pGL2-CVX-ISREII und das Plasmid pMDIC+rLuc wurden zusammen mit den angegebenen Expressionsplasmiden transient in 2fTGH-Zellen transfiziert. Uninduzierte (w/o) und Östrogen-stimulierte (E2) Ansätze wurden verglichen.

Da nur ein geringer Anteil der Transkripte von pIRF-1-hERneo und pIRF-1-GFP-hERneo in ein Neomycinphosphotransferase-Fusionsprotein translatiert wird, andererseits aber eine bestimmte Menge dieses Proteines benötigt wird, um die Zellen G418-resistent zu machen, müßte es möglich sein, durch hohen Selektionsdruck diejenigen Zellen zu erhalten, die viele Transkripte generieren. Diese Zellen müßten zugleich IRF-1-hER- bzw. IRF-1-eGFP-hER-hoch exprimieren, da die Expression der IRF-1-Proteine eng an die des Resistenzmarkers gekoppelt ist. Durch das Fehlen des ATG-Kodons des Neomycinresistenzgenes ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Neomycinphosphotransferase durch zufällige

Rekombinationsereignisse unabhängig von den IRF-1-Proteinen exprimiert wird, sehr gering. Dazu müßte nämlich ein Vektor-Fragment, das die Resistenz kodiert, nicht nur unter die Kontrolle eines Wirtspromotors geraten; es müßte zusätzlich im richtigen Leseraster zu einem ATG-Kodon integrieren.

Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden NIH3T3-Zellen stabil transfiziert. Zum einen wurde das Plasmid pMT7-IRF-1-hER zusammen mit einem Neomycinphosphotransferase-kodierenden Plasmid im üblichen Massenverhältnis 10:1 (Ansatz I), zum anderen wurden die Plasmide pIRF-1-hERneo (Ansatz II) bzw. pIRF-1-GFP-hERneo (Ansatz III) benutzt. Die Selektion und nachfolgende Kultivierung erfolgte durch 1000 µg/ml G418. Zunächst wurde das Transaktivierungspotential der stabilen Klonmischungen verglichen (Abbildung 12A). Die Mischung, die mit pIRF-1-hERneo transfiziert wurde, zeigte nach Östrogenstimulation eine höhere Aktivierung eines IRF-1-responsiven Promotors als die Mischung, die durch Kotransfer von IRF-1-hER und Neomycinresistenzmarker generiert wurde. Die Klonmischung, die mit pIRF-1-GFP-hERneo transfiziert wurde, zeigte allerdings nur eine geringe Promotoraktivierung nach Östrogenstimulation. Außerdem wurden die durch IRF-1-ausgelöste Wachstumsinhibition und Interferonproduktion nach Östrogeninduktion in stabilen Einzelklonen sowie in den Mischungen untersucht (Abbildungen 12B und 12C). Auch hier zeigte die mit pIRF-1-hERneo transfizierte Klonmischung die höchsten Werte, die mit pIRF-1-GFP-hERneo transfizierte Klonmischung die niedrigsten. Sowohl unter den individuellen Klonen von Ansatz I (Kotransfer pIRF-1-hER + Neomycinresistenzplasmid) als auch von Ansatz III (pIRF-1-GFP-hERneo) befanden sich solche, die weder wachstumsreguliert waren noch Interferon produzierten. Diese exprimierten IRF-1-hER bzw. IRF-1-eGFP-hER wahrscheinlich gar nicht oder in nur geringem Maße. Sämtliche getesteten Zellklone von Ansatz II (pIRF-1-hERneo) hingegen exprimierten IRF-1-hER. Sie zeigten allesamt eine Reduktion der Proliferation sowie Interferonproduktion nach Östrogenstimulation und zwar auf durchschnittlich höherem Niveau als die Zellklone der anderen beiden Ansätze.

Die Neomycinphosphotransferase-Fusion ist damit in Bezug auf die Expressionshöhe von IRF-1-hER sowohl in Klonmischungen wie in individuellen Zellklonen dem Kotransfer des Neomycinresistenzmarkers durch ein zweites Plasmid überlegen. Der Vergleich zwischen den Konstrukten pIRF-1-hERneo und pIRF-GFP-hERneo zeigt, das mit pIRF-1-GFP-hERneo-transfizierte Zellmischungen und Einzelklone durchschnittlich weniger wachstumsreguliert waren und weniger Interferon produzierten. Da die Proteine IRF-1-hER und IRF-1-eGFP-hER ein vergleichbar hohes Transaktivierungspotential zeigten (Abbildung 8), sollte dies auf die

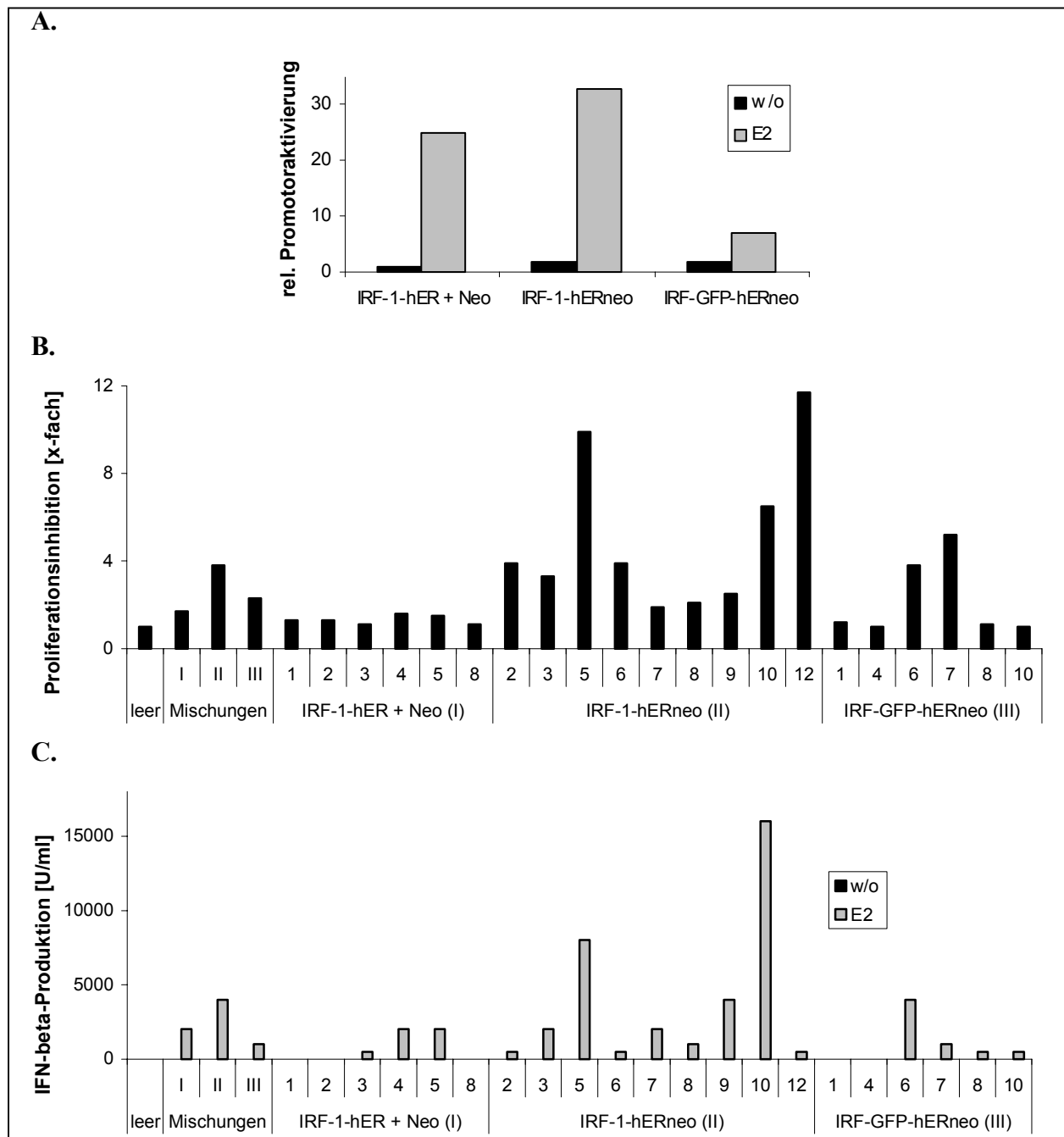


Abb. 12: Vergleich der IRF-1-Aktivität in mit verschiedenen Expressionplasmiden stabil transfizierten NIH3T3-Zellen. (A) Transaktivierungspotential. Der Reporter pGL2-CVX48 und das Plasmid pMPSVHEcat wurden transient in stabile Klonmischungen transfiziert. Uninduzierte (w/o) und Östrogen-stimulierte (E2) Ansätze wurden verglichen. (B) Wachstumsinhibition. Die metabolische Aktivität von uninduzierten und Östrogen-stimulierten stabilen Klonmischungen aus (A) und stabiler Zellklone wurde mit dem WST-Proliferationsassay bestimmt. Die Proliferationsinhibition ergibt sich aus dem Quotienten der Werte des unstimulierten zum Östrogen-stimulierten Ansatz. Für untransfizierte NIH3T3-Zellen (leer) ist dieser Quotient 1. (C) Interferonproduktion. Die Interferonmenge im Überstand unstimulierter (w/o) und für 48 h Östrogen-stimulierter stabiler Klonmischungen und Einzelklone aus (B) wurde bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 100 U Interferon/ml. Interferonproduktion im uninduzierten Ansatz konnte für keine der Zellpopulationen nachgewiesen werden.

Höhe der Proteinexpression zurückzuführen sein. Anscheinend übt IRF-1-eGFP-hER einen größeren negativen Effekt auf die Zellen aus als IRF-1-hER, der der Selektion nach Hochexprimierern entgegenwirkt. Die etwas höhere Basalaktivität im uninduzierten Zustand von IRF-1-eGFP-hER im Vergleich zu IRF-1-hER (Abbildung 8) könnte hier eine Rolle spielen.

Die Neomycinphosphotransferase-Fusion sollte nicht nur die Selektion auf Hochexprimierer erleichtern, sie sollte zudem die Expression des interessierenden Gens über längere Zeiträume stabilisieren. Das spontane Abschalten der Expression rekombinanter Gene durch Methylierung und Veränderung der Chromatinstruktur ist ein häufig beobachteter Effekt. Ist der Integrationsort des Resistenzmarkergenes von dem des interessierenden Gens verschieden, so können selbst bei einer aus einem individuellen Zellklon erzeugten Population resistente Zellen auftreten, die das gewünschte Protein nicht mehr produzieren. Besitzen diese einen Wachstumsvorteil, sinkt die Expression des rekombinanten Proteins in der Population trotz des Selektionsdrucks über die Zeit gegen Null. Durch die enge Kopplung der Expression des Neomycinresistenzmarkers mit der der IRF-1-Proteine sollte deshalb die Expression stabilisiert sein. BHK21-Zellen wurden mit pIRF-1-eGFP-hERneo transfiziert und zwei Monate kultiviert. Anschließende Analyse der IRF-1-eGFP-hER-Aktivität durch Messung der Transaktivierung eines IRF-1-responsiven Promotors nach Östrogeninduktion zeigte eine anhaltend starke Expression von IRF-1-eGFP-hER (Abbildung 13). Bei einem stabil mit dem Plasmid pIRF-1-hERpuro, in dem die Resistenzmarkergenexpression bicistronisch an die von IRF-1-hER gekoppelt ist (MUELLER *et al.*, 1999), transfizierten BHK21-Zellklon hingegen ist ein Abschalten der IRF-1-Aktivität im Verlauf von sieben Wochen beschrieben worden (GESERICK *et al.*, 2000). Dieser Vergleich legt nahe, daß die Neomycinphosphotransferase-Fusion die Expression stabilisiert und dabei der bicistronischen Expression überlegen ist.

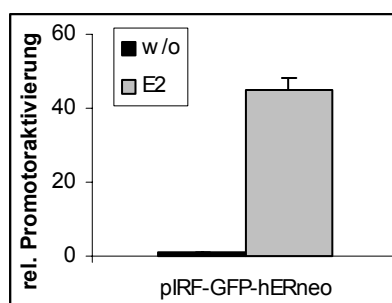


Abb. 13: Die Neomycin-Fusion führt zu stabiler Expression über längere Zeiträume. Ein stabil mit pIRF-GFP-hERneo transfizierter BHK21-Zellklon wurde über 2 Monate kultiviert. Transiente Transfektion des Reporters pGL2-CVX-ISREII und des Plasmids pMDIC+rLuc und Vergleich zwischen den uninduzierten (w/o) und Östrogen-stimulierten (E2) Proben zeigten, daß das IRF-1-Fusionsprotein nach diesem Zeitraum noch immer exprimiert wurde.

2.2. Anwendung des proliferationsinhibitorischen Potentials von IRF-1 zur Regulation des Wachstums von Helferzellen bei der Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen

Um Stammzellen in einem möglichst undifferenzierten Zustand zu halten, werden sie häufig mit Helferzellen kokultiviert. Um ein Überwachsen der langsam proliferierenden Stammzellen zu vermeiden, werden die Helferzellen üblicherweise in ihrem Wachstum angehalten. Die Inhibition der Proliferation humaner Helferzellen durch Bestrahlung ist problematisch, da häufig entweder ein Weiterwachsen oder ein Ablösen der Zellen vom Kultivierungsgefäß auftreten. Am Beispiel der menschlichen Stromazelllinie L88/5 (THALMEIER *et al.*, 1994), die als Helferzelllinie bei der Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen benutzt werden kann, wurde nun mittels genetischer Manipulation ein alternatives Proliferationskontrollsystem etabliert. *Ein Teil der Arbeiten wurde in der Abteilung für Hämatologie der Universitätsklinik Frankfurt in Zusammenarbeit mit Dr. Koschmieder ausgeführt.*

2.2.1. Wachstumsregulation in einer humanen Stromazelllinie durch IRF-1-hER

L88/5-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für IRF-1-hER transfiziert. Da die in Kapitel 2.1. beschriebenen Vektoren zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgetestet waren, wurde das Konstrukt pIRF-1-hERpuro (MUELLER *et al.*, 1999) verwendet. Dieses enthält die Gene für IRF-1-hER und den Resistenzmarker, die Puromycin-Acetyltransferase, in einer bicistronischen Konfiguration und erlaubt das Ablesen beider Gene von einer gemeinsamen mRNA. Das zwischen den beiden Genen liegende Internal Ribosomal Entry Site (IRES)-Element aus dem Poliovirus ermöglicht dabei die Cap-unabhängige Translation des zweiten Cistrons (SONENBERG, 1990). Es wurden individuelle Klone isoliert. Alle neun getesteten Zellklone zeigten ein verringertes Wachstum nach Östrogeninduktion (Abbildung 14A zeigt stellvertretend drei davon). Der Klon Nummer 3 wurde aufgrund seiner strikten Wachstumsinhibition für alle folgenden Versuche verwendet und wird im weiteren als L88I bezeichnet. Aus nicht näher untersuchten Gründen wuchsen L88I-Zellen schon im uninduzierten Zustand ein wenig langsamer als die L88/5-Zellen (Abbildung 14B). Steigende Östrogenkonzentrationen hemmten das Wachstum von L88I-Zellen graduell, während das Wachstum von L88/5-Zellen selbst bei der höchsten verwendeten Östrogenkonzentration unbeeinflusst blieb (Abbildung 14B). Aus einem anderen System (Kapitel 2.3.1.) war bekannt, daß der inhibitorische Einfluß auf die Zellproliferation nicht nur bei permanenter Gegenwart von Östrogen auftritt. Schon ein kurzer Östrogenpuls kann das Wachstum über längere Zeit

vermindern. Fortwährende Wachstumsinhibition nach transientser Induktion ist insofern ein Vorteil, als bei der Kokultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen auf Östrogen im Medium verzichtet werden kann. Etwaige Einflüsse dieses Hormons auf die Stammzellen werden so umgangen. Eine transiente Behandlung mit 10 nM Östrogen für 24 h reduzierte die L88I-Proliferation über mindestens neun Tage. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Kultur Konfluenz. Die hohe Zelldichte führte durch Verbrauch des Mediums zu einem Absterben der Zellen. Parallele Ansätze unbehandelter L88I- und L88/5-Zellen erreichten diesen Status schon nach fünf bzw. sieben Tagen. L88I-Zellen, die für 24 h mit 100 nM Östrogen behandelt wurden, zeigten am Tag elf, bei Abbruch des Experimentes, lediglich ein Viertel der maximalen Zelldichte (Abbildung 14C). Bis zum Erreichen der Konfluenz lag dabei die Viabilität aller Kulturen bei über 95% und die Zellen waren fest am Gefäßboden adhärirt.

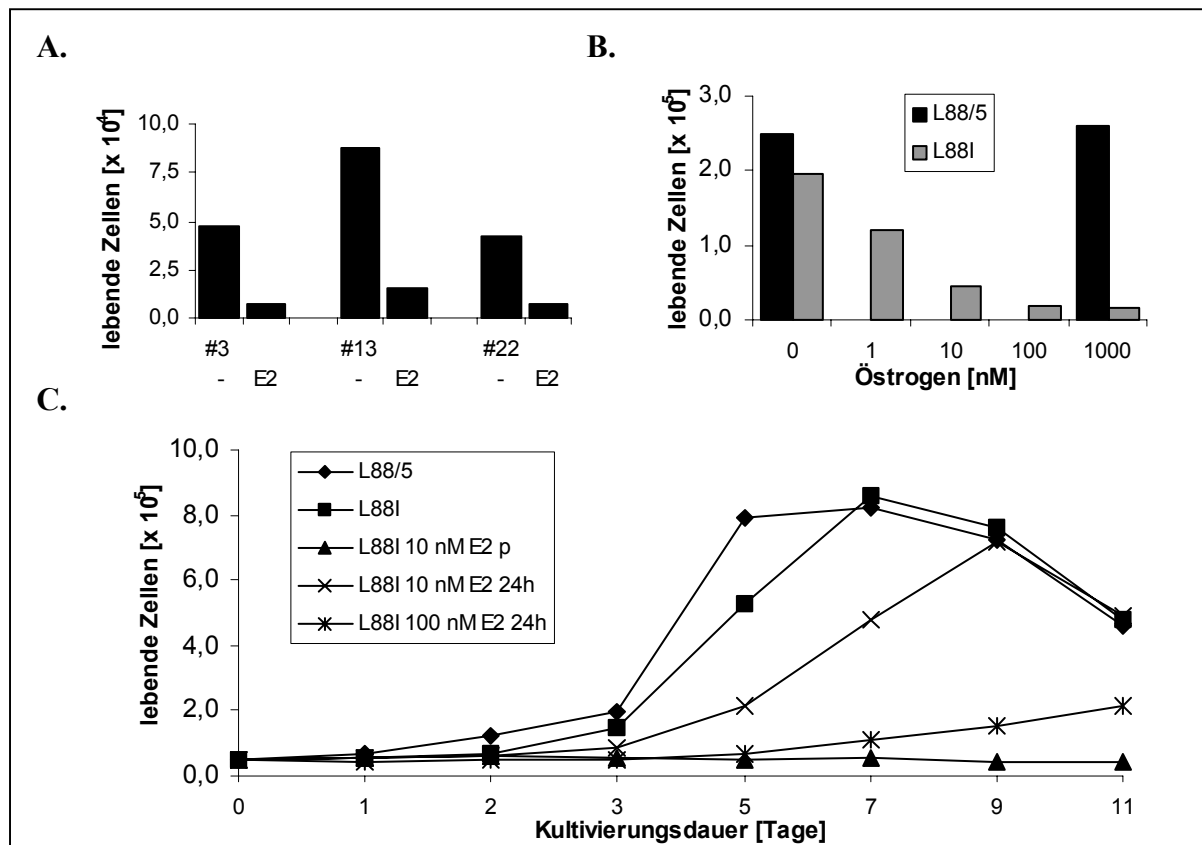


Abb. 14: Wachstumsregulation von L88I-Stromazellen durch Östrogen-Behandlung. (A) Die Zellzahlen der stabil mit pIRF-1-hERpuro transfizierten L88/5-Einzelklone #3, #13 und #22 wurde zwischen uninduzierten (-) und permanent mit 1 μ M Östrogen behandelten (E2) Proben nach 3 Tagen verglichen. Klon #3 wird im weiteren als L88I bezeichnet. (B) Die Anzahl der nach 4 Tagen Kultivierungsdauer vorhandenen L88I-Zellen nahm mit zunehmender Östrogenkonzentration (E2) im Medium graduell ab, während L88/5-Zellen auf Östrogen nicht mit Wachstumsinhibition reagierten. (C) Anhaltende Wachstumsregulation von L88I-Zellen wurde nicht nur bei permanenter Östrogen-Stimulation (p), sondern auch bei einer transienten Östrogen-Stimulation, die lediglich während der ersten 24 h erfolgte, beobachtet.

Die Behandlung mit Östrogen führte erwartungsgemäß in L88I-Zellen nicht aber in L88/5-Zellen zu IRF-1-Aktivität. Dies wurde mithilfe eines Reporterassays durch das Anschalten eines IRF-1-responsiven Promotors nachgewiesen (Abbildung 15).

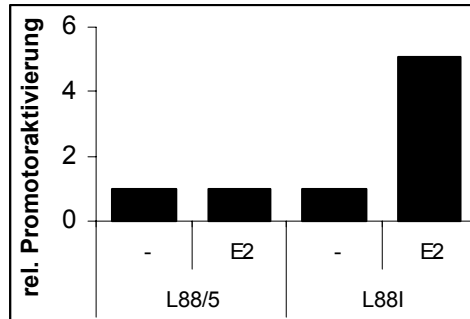


Abb. 15: IRF-1-Aktivität ist in L88I-Zellen, nicht aber in L88/5-Zellen nachweisbar. Der Reporter pGL2-CVX48 und das Plasmid pMPSVHEcat wurden transient in L88/5- bzw. L88I-Zellen transfiziert. Unstimulierte (-) und mit 100 nM Östrogen behandelte (E2) Ansätze wurden verglichen.

2.2.2. Konservierung der Zelloberflächenmarkerexpression und der Cytokinproduktion in der IRF-1-hER-regulierten Stromazelllinie

Die zur Wachstumskontrolle angewendete Manipulation der Stromazellen darf die Eigenschaften, die zu ihrer Funktion als Helferzellen bei der Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen benötigt werden, nicht negativ beeinflussen. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob das Profil an Oberflächenmarkern auf den Stromazellen auch unter IRF-1-Wirkung erhalten bleibt. Neben den für die L88/5-Zellen schon aus der Literatur bekannten Markern CD10, CD13 und CD71 (THALMEIER *et al.*, 1994) wurden auch das DIA120-Antigen und ICAM-1 (CD54) detektiert. DIA120 ist ein Fibroblastenmarker. Seine Präsenz unterstreicht die Vermutung, daß sich die L88/5-Zellen aus Knochenmarkfibroblasten ableiten (THALMEIER *et al.*, 1994). ICAM-1 spielt eine Rolle bei der Adhäsion der hämatopoetischen Stammzellen an die Stromazellen (TEIXIDO *et al.*, 1992). 50% der L88/5-Zellen exprimierten detektierbar ICAM-1. Die Stromazellen trugen hingegen kein CD45, ein Leukozytenantigen, auf ihrer Oberfläche und lassen sich in der FACS-Analyse somit leicht von hämatopoetischen Zellen unterscheiden. Alle getesteten Antigene wurden von L88/5- und L88I-Zellen unabhängig davon, ob diese mit Östrogen behandelt wurden oder nicht, in vergleichbarem Maße exprimiert (Abbildung 16).

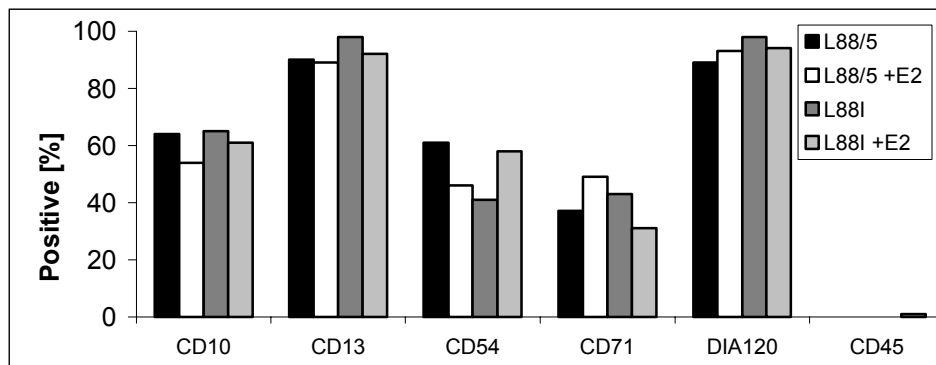


Abb. 16: Die Expression charakteristischer Oberflächenmarker ist in L88I-Zellen im Vergleich zu den parentalen L88/5-Zellen konserviert. Die Zellen wurden entweder unstimuliert belassen oder für 24 h mit Östrogen (E2) behandelt und per FACS weitere 24 h später analysiert.

Es war bekannt, daß L88/5-Zellen Transforming Growth Factor beta (TGF- β), einen Inhibitor hämatopoetischer Zellproliferation (SITNICKA *et al.*, 1996), sekretieren (THALMEIER *et al.*, 1996). Ein Elisa-Test zeigte, daß L88/5- und L88I-Zellen vergleichbare Mengen TGF- β produzierten, auch unter dem Einfluß von IRF-1-Aktivität (Tabelle 2).

IRF-1 kann in manchen Zellen die Expression von Interferon- β induzieren (FUJITA *et al.*, 1989b). Nach Stimulation der L88I-Zellen mit bis zu 100 nM Östrogen wurde jedoch keine IFN- β -Produktion beobachtet (Tabelle 2). L88/5- und L88I-Zellen konnten aber nach Sendai-Virus-Infektion bis zu 1000 U/ml IFN- β sekretieren (Abbildung 17 und nicht gezeigte Daten). Dies zeigt, daß in L88/5-Zellen kein allgemeiner Defekt in der Interferonproduktion vorliegt. Wahrscheinlich ist vielmehr, daß Kofaktoren, die mit IRF-1 synergistisch IFN- β induzieren, fehlen. L88/5- und L88I-Stromazellen reagierten auf geringe Mengen (50 U/ml) IFN- β nicht mit einer Verlangsamung des Wachstums (Abbildung 18). Da nach IRF-1-Aktivierung von L88I-Zellen weniger IFN- β sekretiert wurde, als der Nachweisgrenze von 8 U/ml entsprach, kann somit geschlossen werden, daß die Wachstumsregulation der L88I-Zellen nach Östrogengabe nicht durch IFN- β verursacht wurde.

Damit scheinen die für die Kokultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen notwendigen Eigenschaften der L88/5-Zellen, nämlich die Expression Zell-Zell-Kontakt-vermittelnder Oberflächenmarker und die Produktion wichtiger Cytokine, in der neuen, IRF-1-kontrollierten Stromazelllinie L88I konserviert zu sein. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Kokulturversuche mit hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt.

Tab. 2: Cytokinproduktion von L88/5- und L88I-Zellen

	IFN- β	TGF- β
	[U/ml]	[pg/10 ⁵ Zellen in 48 h]
L88/5	< 8	47 +/- 5
L88I	< 8	65 +/- 5
L88I 10 nM E2	< 8	51 +/- 5
L88I 100 nM E2	< 8	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

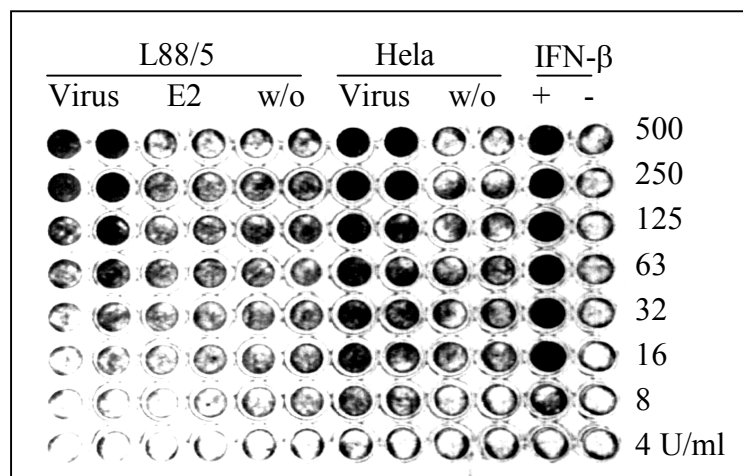


Abb. 17: L88/5-Stromazellen produzieren Interferon nach Sendai-Virus-Infektion. L88/5-Zellen wurden für 2 h mit Sendai-Virus oder für 24 h mit 1 μ M E2 inkubiert. 24 h später wurde die Interferonmenge im Überstand bestimmt. Parallel behandelte HeLa-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle für die Sendai-Virus-Infektion. Die Abbildung zeigt den Interferontest. Verorzellen wurden mit den Überständen der HeLa- bzw. Stromazellen inkubiert. Die Überstände wurden von der obersten zur untersten Reihe jeweils 1:2 verdünnt. Anschließend wurden die Verorzellen mit VSV infiziert. Vor der Lyse durch VSV geschützte Verorzellen wurden nach der Kristallviolett-färbung als dunkle Löcher sichtbar. Humanes IFN- β diente als Positiv-Kontrolle und war in den rechts angegebenen Konzentrationen in den einzelnen Löchern der zweitletzten Reihe (+) vorhanden. Die Nachweisgrenze lag hier bei 8 U/ml IFN- β .

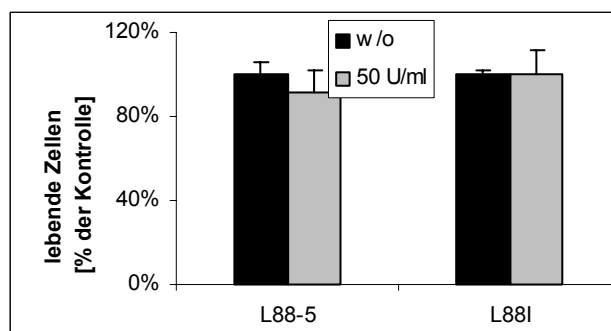


Abb. 18: L88/5-Stromazellen reagieren auf geringe Mengen IFN- β nicht mit verringertem Wachstum. Die Zellen wurden ohne (w/o) oder mit (50 U/ml) humanem Interferon- β für 4 Tage kultiviert.

2.2.3. Erhaltung der zur Kokultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen notwendigen Eigenschaften in der IRF-1-hER-regulierten Stromazelllinie

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen und frühe Progenitorzellen, die sich noch teilen und in mehrere Blutzelltypen differenzieren können, exprimieren den Oberflächenmarker CD34, während späte Progenitoren und ausdifferenzierte Blutzellen dies nicht mehr tun. Die CD34⁺-Zellen befinden sich im Knochenmark, können aber durch G-CSF-Behandlung mobilisiert werden, so daß sie aus dem peripheren Blut gefiltert werden können. Auf diese Weise isolierte humane CD34⁺-Zellen wurden ohne oder auf einer Schicht von Stromazellen (Abbildung 19) für sechs Tage kultiviert und anschließend auf die Expression von Differenzierungs-spezifischen Oberflächenmarkern und auf ihre Fähigkeit, Blutzellkolonien zu bilden, getestet.

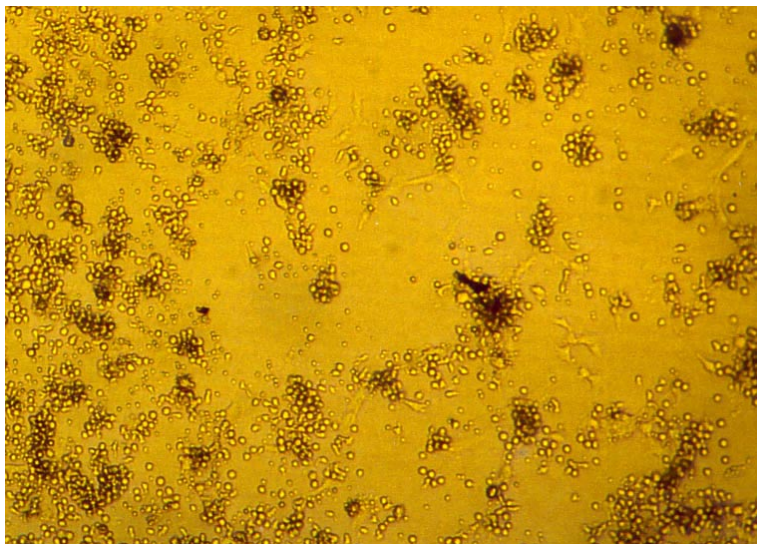


Abb. 19: Kokultur von Stromazellen mit CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen. Die kleinen runden Zellen sind hämatopoetische Zellen. Darunterliegende größere, langgestreckte und am Gefäßboden adhäre Zellen sind Stromazellen. Die Stammzellen sammelten sich bevorzugt auf den Stromazellen.

Zunächst wurden unbehandelte und Östrogen-induzierte L88/5- bzw. L88I-Stromazellen verwendet. Nach sechs Tagen hatten die L88/5-Zellen den Punkt der Konfluenz überschritten ein rapider Verlust der Viabilität nicht nur der Stromazellen, sondern auch der hämatopoetischen Zellen trat aufgrund des Mediumverbrauches auf (Abbildung 20A). Der Bedarf einer Wachstumsregulation der Stromazellen wird hierdurch deutlich. In den Parallelansätzen mit L88I-Stromazellen blieb die Viabilität der hämatopoetischen Zellen aufgrund niedrigerer Gesamtzellzahlen unvermindert hoch (Abbildung 20A).

In einem zweiten Experiment wurden dann bestrahlte L88/5-Zellen und Östrogen-behandelte L88I-Zellen als Helferzellen verwendet. L88I-Stromaschichten führten zu einer stärkeren Expansion der Zahl an hämatopoetischen Zellen (Abbildung 20B).

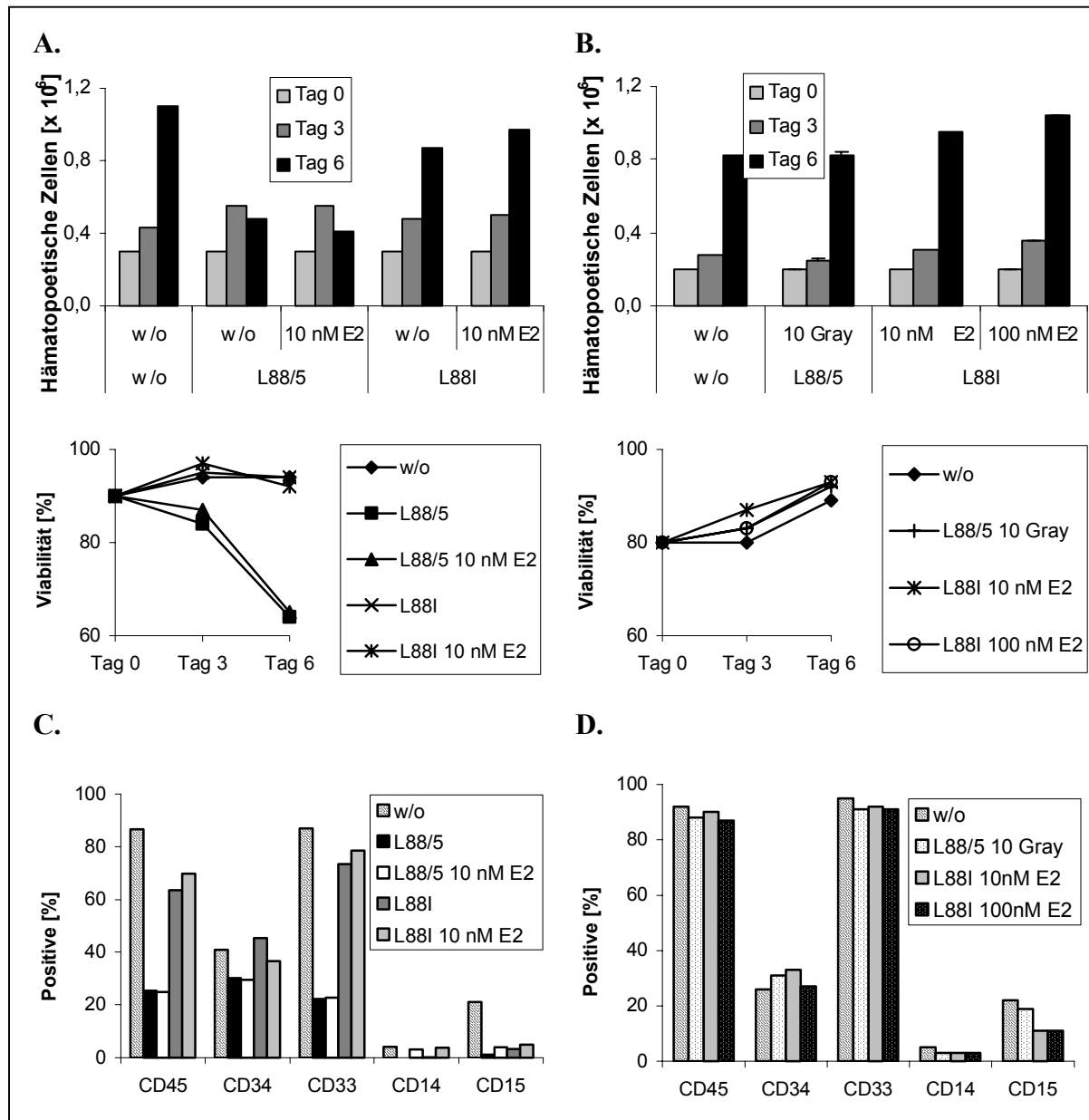


Abb. 20: L88I-Zellen sind in der Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen vergleichbar effektiv wie L88/5-Zellen. (A, B) Anzahl und Viabilität der hämatopoetischen Stammzellen nach 0, 3 und 6 Tagen Kultivierung mit den angegebenen Stromaschichten sind dargestellt. (C, D) Die Oberflächenmarker der hämatopoetischen Zellen aus (A) und (B) wurden nach 6 Tagen Kultivierung durch FACS-Analyse bestimmt.

Zur Charakterisierung des Differenzierungsstatus` der hämatopoetischen Zellen wurden deren Oberflächenmarker nach sechs Tagen Kultivierung untersucht. CD45 ist auf hämatopoetischen Zellen, nicht aber auf Stromazellen exprimiert. Der hohe Prozentsatz an CD45⁺-Zellen (Abbildungen 20C und 20D) zeigt, daß die Präparationen der für die FACS-Analyse und auch für die Koloniebildungstests verwendeten hämatopoetischen Zellen sehr rein war und nur geringe Kontaminationen an Stromazellen enthielt. Lediglich bei den hämatopoetischen Zellen, die mit nicht wachstumsregulierten L88/5-Zellen kokultiviert

wurden, lag der Anteil an CD45⁺-Zellen bei weniger als 30%. Da mikroskopische Untersuchungen keine signifikanten Stromakontaminationen in diesen Fraktionen zeigten, ist der niedrige CD45⁺-Anteil wahrscheinlich auf einen schlechten Zustand der hämatopoetischen Zellen zurückzuführen, der sich auch in der niedrigen Viabilität widerspiegelte. Das gleiche gilt für den Oberflächenmarker CD33. CD33 ist charakteristisch für myeloide Vorläufer. Der hohe Prozentsatz an CD33⁺-Zellen nach sechs Tagen Kultivierung wurde von einem niedrigen Prozentsatz an CD19⁺-Zellen antagonisiert (Abbildungen 20C, 20D und nicht gezeigte Daten). CD19 ist der typische Oberflächenmarker lymphoider Vorläuferzellen. Diese lassen sich generell sehr schlecht kultivieren, so daß nach einigen Tagen hauptsächlich myeloide Progenitoren in den Kulturen zu finden waren. CD34 exprimieren lediglich frühe Vorläuferzellen. Eine sinkende Anzahl von CD34⁺-Zellen deutet somit auf die Entwicklung der Blutstammzellen zu etwas höher differenzierteren Zellen hin. Der Anteil von hämatopoetischen Zellen, die CD34 exprimierten, sank in allen Kokulturen in vergleichbarem Maße. Dennoch waren Unterschiede im Anteil der vollständig ausdifferenzierten Blutzellen zwischen den Kulturen erkennbar. CD15-Expression kennzeichnet Granulozyten. Die Gegenwart von Stromaschichten reduzierte die Anzahl der in der Kultur vorhandenen CD15⁺-Zellen (Abbildung 20C und 20D).

Hämatopoetische Stammzellen werden über ihre Fähigkeit definiert, Blutzellkolonien zu bilden. Man unterscheidet den Typ CFC-GM (Colony Forming Cell-Granulocyte/Macrophage) von BFU-E (Burst Forming Unit-Erythrocyte), je nach der Art der gebildeten Tochterzellen. Aus sehr frühe Progenitoren können zudem sogenannte CFC-Mix-Kolonien entstehen, die verschiedene Arten von Blutzellen enthalten (HUMPHRIES *et al.*, 1981). Anzahl und Art der in den Kulturen vorhandenen Kolonie-bildenden Zellen (CFC) wurde mit einem Methylzellulosetest bestimmt (Abbildung 21). Dabei wurden die Populationen an hämatopoetischen Zellen verglichen, die sich nach drei bzw. sechs Tagen Kultivierung ohne Stromaschicht oder in Gegenwart von bestrahlten L88/5- bzw. IRF-1-regulierten L88/I-Stromazellen gebildet hatten. Stromazellen stimulierten die anfängliche Expansion der CFC, insbesondere auch der CFC-Mix (Abbildung 21A). IRF-1-regulierte L88I-Zellen zeigten die besten Expansionen. Nach sechs Tagen war die Anzahl der CFC-GM sogar doppelt so hoch wie im Stroma-freien Ansatz (Abbildung 21B). Die Gegenwart von Stromazellen führte nach sechs Tagen zu einer mehr ausgeglichenen Verteilung zwischen CFC-GMs und BFU-Es als dies in den Stroma-freien Kulturen der Fall war. Die Gründe hierfür wurden nicht näher untersucht. Eine mögliche Erklärung wäre aber, daß die Ausschüttung von Cytokinen wie GM-CSF und G-CSF durch die Stromazellen dazu beitrug. Der Prozentsatz an CFC an der

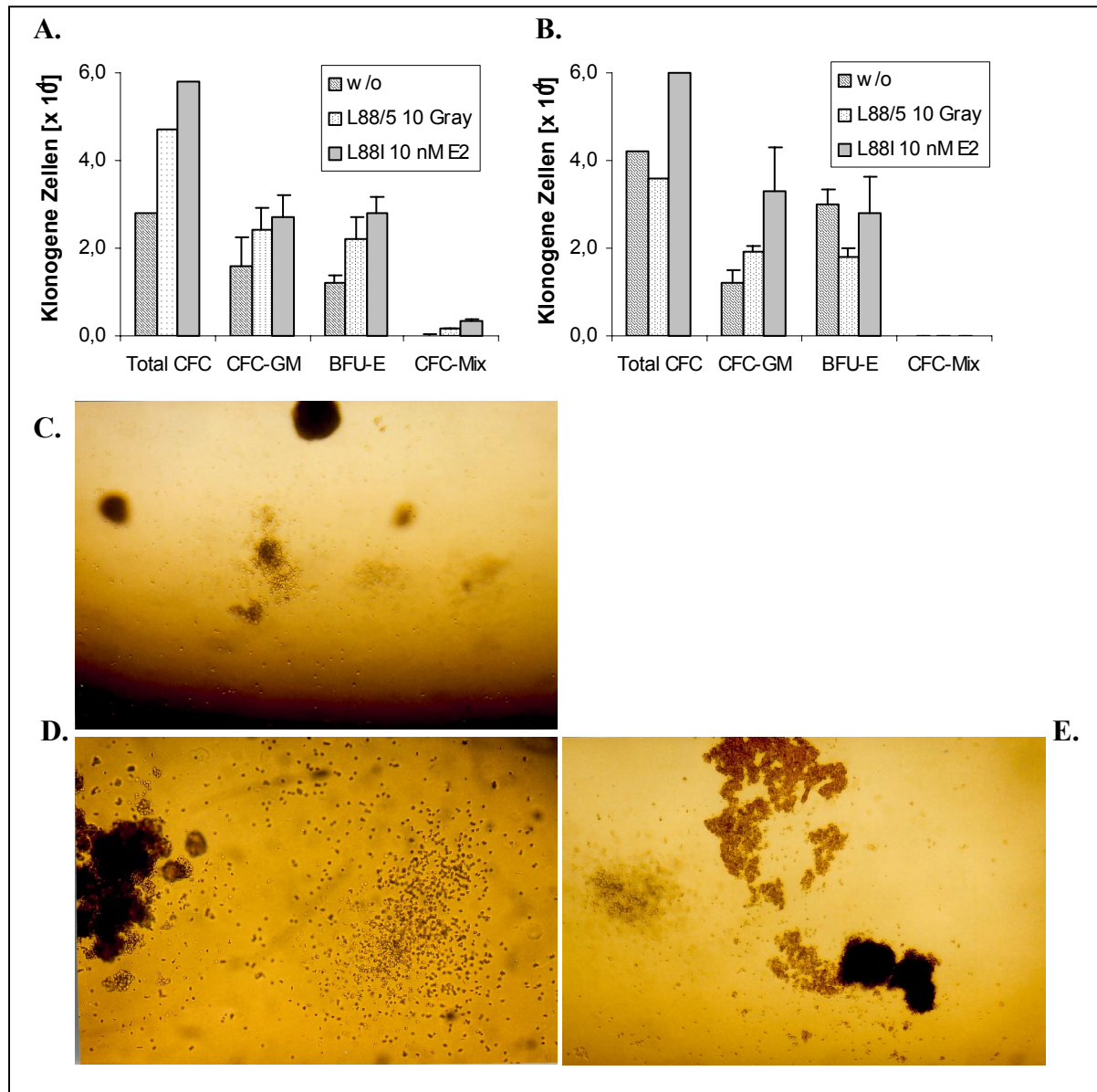


Abb. 21: L88I-Stromaschichten unterdrücken die Differenzierung hämatopoetischer Zellen. (A, B) Die Anzahl klonogener Zellen, die sich nach 3 (A) bzw. 6 (B) Tagen Kultivierung auf den angegebenen Stromazellschichten unter den in Abb. 20B beschriebenen hämatopoetischen Zellen befand, wurde durch Koloniebildungstests bestimmt. (C, D, E) Die Fotos zeigen hämatopoetische Kolonien aus den Koloniebildungstests. Dunkle, dicht gepackte Kolonien bestehen aus Zellen erythroider Linien (BFU-E), während helle, weiter verstreute Kolonien von Zellen lymphoider Linien (CFC-GM) gebildet werden. Die Größe der Kolonien, die von Zellen gebildet wurden, die ohne Stroma kultiviert wurden (C), ist signifikant kleiner als die von Kolonien aus Zellen, die in Gegenwart bestrahlter L88/5-Stromazellen (D) oder E2-behandelter L88I-Zellen (E) gehalten wurden.

Gesamtzahl hämatopoetischer Zellen (vergleiche Abbildung 20B mit Abbildung 21) sank während der Kultivierung unabhängig von der Abwesenheit oder Gegenwart von Stromazellen. Wahrscheinlich war eine Akkumulation sich nicht mehr teilender, ausdifferenzierter Zellen hierfür verantwortlich. Auffällig war allerdings, daß sich die Größe der gebildeten Kolonien stark unterschied, je nachdem, ob die Kultivierung mit oder ohne Stroma stattgefunden hatte. Die Kolonien, die von hämatopoetischen Stammzellen, die in Gegenwart von Stroma kultiviert wurden, gebildet wurden, waren deutlich größer als solche aus der Stroma-freien Kultur (Abbildung 21C, 21D und 21E). Dies deutet auf einen positiven Effekt des Stromas entweder auf die Teilungskapazität oder auf den Erhalt eines möglichst undifferenzierten Status' der Stammzellen hin. Die durchschnittliche Koloniegröße war zwischen den Kokulturen mit bestrahlten L88/5 und IRF-1-regulierten L88I identisch.

Somit wurde gezeigt, daß sich die durch IRF-1 in ihrem Wachstum regulierte Stromazelllinie L88I von der durch Bestrahlung wachstumsinhibierten L88/5-Linie in wichtigen Eigenschaften wie der Cytokinproduktion und der Oberflächenmarkerexpression nicht unterscheidet und daß beide Linien in der Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen mindestens vergleichbare positive Einflüsse zeigen.

2.3. Apoptoseinduktion durch Synergismus von IRF-1 und EGFR

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich im wesentlichen nicht mit den proliferationshemmenden Eigenschaften von IRF-1, sondern untersucht seine Kooperation mit onkogenen Signalen. Als Beispiel wurde die Synergie mit dem EGFR gewählt.

Soweit nicht anders erwähnt wurden für die nachfolgenden Versuche NIH3T3-Zellen verwendet, die den humanen EGFR und das IRF-1-hER-Fusionprotein stabil exprimieren (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Sie werden als KA1-10/96-1A-Zellen bezeichnet.

2.3.1. Kooperation von IRF-1 und EGFR in der Induktion von Promotoren

Das Zusammenspiel von IRF-1 und EGFR-Signalwegen induziert Apoptose (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Neben dem Zelltod wurde zudem ein kooperativer Effekt auf die Induktion zweier Promotoren beobachtet (Tabelle 3 und Abbildung 22A, linke Seite nach KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Diese Vektoren, pGL2-CVX48 und pGL2-CVX-ISREII, enthalten das firefly Luciferase (fLuc)-Reportergen unter minimalen CMV-Promotoren, in die IRF-1-responsive Elemente integriert wurden. In den Versuchen wurde das Plasmid pMPSVHEcat, das den Reporter Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven MPSV-Promotors enthält, zum Abgleich der Transfektionseffizienz verwendet. Die relative Induktion ergab sich aus dem Quotienten von fLuc und CAT. Diese Daten konnten zunächst reproduziert werden.

Tab. 3: Relative Promotorinduktion der angegebenen Reporter nach transienter Transfektion zusammen mit dem Plasmid pMPSVHEcat in KA1-10/96-1A-Zellen

	w/o	E2	EGF	E2 + EGF
pGL2-CVX48	1	8	3	29
pGL2-CVX-ISREII	1	30	2	60

Bei der Verwendung eines anderen Plasmids als Transfektionsabgleich, pMDIC+rLuc, ergab sich allerdings kein synergistischer Effekt in der relativen Promotorinduktion von pGL2-CVX48 (Tabelle 4 und Abbildung 22A, rechte Seite). Parallel durchgeführte Versuche zeigten, daß dies nicht auf einen Defekt der Zellen zurückzuführen war und die verwendeten Zellen sehr wohl IRF-1-hER und EGFR exprimierten, da Apoptose nach Östrogen- und EGF-Stimulation induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4: Induktion der Promotoren der angegebenen Plasmide nach transienter Transfektion in KA1-10/96-1A-Zellen

	w/o	E2	EGF	E2 + EGF
fLuc (pGL2-CVX48)	1	19	2	39
rLuc (pMDIC+rLuc)	1	1	2	2
rel. Promotorinduktion	1	19	1	20

Deswegen wurden die beiden Plasmide, die zum Transfektionsabgleich verwendet wurden, gemeinsam mit dem Basisvektor pGL2-CVX, der kein IRF-1-Bindungselement enthält, in die Zellen transfiziert und die Quotienten gebildet (Tabelle 5 und Abbildung 22B). IRF-1-Aktivierung beeinflusste erwartungsgemäß keinen der Reporter in signifikantem Maße. Es wurde aber deutlich, daß bei Induktion mit EGF die Promotoren von pMDIC+rLuc und pGL2-CVX zweifach stimuliert wurden, während pMPSVHEcat hiervon nicht beeinflusst wurde. Je nach Transfektionsabgleich ergab sich also entweder keine Induktion oder eine zweifache Induktion für den Promotor in pGL2-CVX nach EGF-Stimulation (vergleiche Reihe „fLuc / CAT“ mit Reihe „fLuc / rLuc“ in Tabelle 5 und Abbildung 22B).

Tab. 5: Induktion der Promotoren der angegebenen Plasmide nach transienter Transfektion in KA1-10/96-1A-Zellen

	w/o	E2	EGF	E2 + EGF
fLuc (pGL2-CVX)	1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1
rLuc (pMDIC+rLuc)	1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1
CAT (pMPSVHEcat)	1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
rluc / CAT	1	1,1	2,1	2,4
fLuc / CAT	1	0,9	1,9	1,7
fLuc / rLuc	1	0,8	0,9	0,7

Da die Reporterexpression des Basisvektors pGL2-CVX durch EGF induziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß ein durch EGF aktivierter Transkriptionsfaktor in dessen Promotorbereich bindet. pGL2-CVX enthält allerdings lediglich ein 50 bp Element aus dem CMV-Promotor, das den Bereich um die TATA-Box kodiert. Da pGL2-CVX keine IRF-1-Bindungsstellen enthält und durch IRF-1 auch nicht induziert wurde, war die Induktion durch EGF unabhängig von einer Bindung von IRF-1 an den Promotor.

Betrachtet man nun die relativen Induktionen der Reportergene der Vektoren pGL2-CVX48 und pGL2-CVX-ISREII (Tabelle 3), so erkennt man, daß sich die jeweilige Induktion durch Östrogen und EGF multiplikativ aus den einzelnen Induktionen zusammensetzte. Das heißt, hier überlagerten sich zwei voneinander unabhängige Effekte. Die IRF-1-Bindung an die Promotoren wurde also keineswegs verstärkt, noch trat eine synergistische Wirkung von

IRF-1 und EGFR auf die Promotoren auf, die die bloße Überlagerung der Induktionen überstieg.

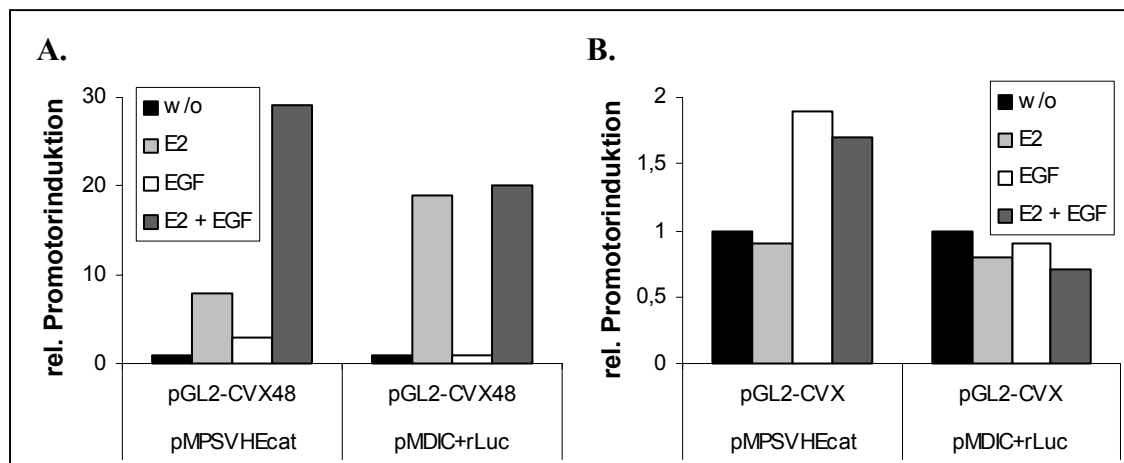


Abb. 22: Je nach Transfektionsabgleich ergeben sich unterschiedliche relative Induktionen für pGL2-CVX48 und pGL2-CVX bei EGF-Stimulation. (A, B) Die angegebenen Plasmide wurden transient in KA1-10/96-1A-Zellen transfiziert. Uninduzierte (w/o), Östrogen-stimulierte (E2), EGF-stimulierte und E2 + EGF-stimulierte Ansätze wurden verglichen. Die relative Promotoraktivierung ergibt sich aus dem Quotienten von firefly Luciferaseaktivität und CAT-Protein-Menge bzw. renilla Luciferaseaktivität. Sie wurde jeweils für den uninduzierten Ansatz auf 1 gesetzt und es wurden die weiteren Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

2.3.2. Kinetik des IRF-1/EGFR-induzierten Zelltodes

Permanente Stimulation von KA1-10/96-1A-Zellen mit Östrogen und EGF über fünf Tage führte zu rapidem Zelltod. Dieser setzte am dritten Tag der Induktion ein und bewirkte, daß schließlich fast alle Zellen in die Apoptose gingen. IRF-1-Aktivierung durch Östrogenbehandlung hingegen reduzierte die Anzahl der Zellen nach 5 Tagen Induktion lediglich auf einen Wert, der etwa einem Drittel der Zellzahl im unbehandelten Kontrollansatz entsprach. EGF-Behandlung alleine bewirkte sogar eine leichte Steigerung der Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 23A, schwarze Balken).

Die Länge des Zeitintervalls der Induktion, das notwendig war, um die Zellen unwiederbringlich für die Aktivierung der Apoptose zu programmieren, wurde eingeschränkt. Eine Induktion für 24 h war ausreichend, um den Zelltod in den darauffolgenden vier Tagen zu bewirken (Abbildung 23A, graue Balken). Eine Induktion für 1h löste hingegen keinen synergistischen Zelltod aus (Abbildung 23A, weiße Balken). Die durch IRF-1 vermittelte Wachstumsinhibition war allerdings nach fünf Tagen Kulturdauer deutlich sichtbar wenn die Induktion nur für 1 h erfolgte und nur wenig niedriger als bei permanenter

Östrogenbehandlung. Eine transiente EGF-Behandlung, selbst für 24 h, bewirkte keine verstärkte Proliferation in den folgenden vier Tagen.

Um die beiden Signale, die durch IRF-1 und EGFR ausgelöst wurden zeitlich zu trennen, wurden die Zellen nacheinander mit Östrogen und EGF stimuliert. Der erste Induktionsschritt dauerte 24 h, gefolgt von einem Waschvorgang und einer zweiten Induktion für weitere 4 Tage. IRF-1-Präaktivierung, nicht aber IRF-1-Postaktivierung führte dabei zu Zelltod (vergleiche linke und rechte Hälfte von Abbildung 23B). Dies zeigt, daß ein Östrogen-Puls von 24 h ausreichte, um eine persistierende, IRF-1-induzierte Veränderung zu bewirken, die die Zellen für die Auslösung des Zelltodes durch die nachfolgende EGF-Behandlung sensibilisierte. Im Gegensatz dazu war das EGF-Signal transienter Natur, da die IRF-1-Aktivierung nach 24 h EGF-Vorbehandlung zu keiner weiteren Abnahme der Zellzahl führte als über das Maß hinaus, das IRF-1-Aktivierung alleine bewirkte. Ein EGF-Puls von 24 h war aber ausreichend für die Auslösung des EGFR-Signals, das in der Induktion der Apoptose beteiligt war wie oben gezeigt.

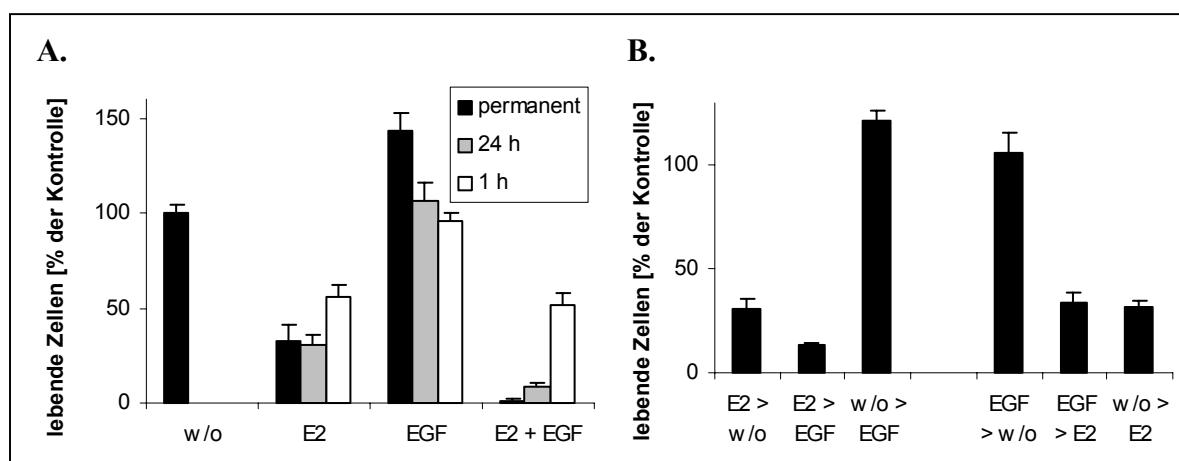


Abb. 23: Eine Transiente Aktivierung von EGFR und IRF-1 ist ausreichend, um Zelltod zu induzieren. (A) KA1-10/96-1A-Zellen wurden permanent, während der ersten 24 h oder während der ersten Stunde ohne Zusatz (w/o), mit Östrogen (E2) und/oder EGF behandelt. Die Zellzahlen wurden nach insgesamt 5 Tagen Kultivierungsdauer bestimmt. **(B)** Die Zellen wurden zunächst ohne Zusatz, mit E2 oder mit EGF für 24 h inkubiert. Nach einem Waschschritt und einem Mediumwechsel erfolgte ein zweiter Induktionsschritt für weitere 4 Tage bis zur Zählung der Zellen. Induktionsschema: (1. Induktionsschritt) > (2. Induktionsschritt)

Transiente Behandlung mit Östrogen war also offensichtlich ausreichend, um eine persistierende IRF-1-Aktivität in den Zellen zu etablieren. Um abzuschätzen, ob IRF-1-Wirkungen lediglich wenige Stunden oder über einen längeren Zeitraum hinaus nach der Wegnahme von Östrogen erhalten bleiben, wurde die Kinetik der Produktion von Interferon untersucht. Bereits nach 6 h Östrogenbehandlung war Interferon deutlich im Überstand

nachweisbar. Nach einem 24-stündigen Induktionspuls und Wegwaschen des Östrogens akkumulierte Interferon noch über mindestens fünf Tage (Abbildung 24). Die Produktivität sank dabei nach dem Auswaschen des Östrogens über die Zeit. Das Ergebnis ist allerdings unerwartet, da die Halbwertszeit der Interferon- β mRNA kurz ist. Nach Beenden der Transkription sollte die Translation von Interferon- β schneller sinken. Ein Verbleiben von Östrogen in den Zellen scheint aber unwahrscheinlich, da dieses Molekül sehr diffusionsfähig ist. Dieser Versuch beweist folglich, daß ein durch IRF-1 ausgelöstes Signal über mehrere Tage wirken kann. Er zeigt nicht, daß IRF-1-hER über einen längeren Zeitraum nach Östrogenwegnahme die Transkription seiner Targetgene aktiviert, da durch IRF-1 induzierte Proteine auf die Zellen zurückwirken können und somit wiederum selbst die Produktion von weiterem Interferon bewirken können.

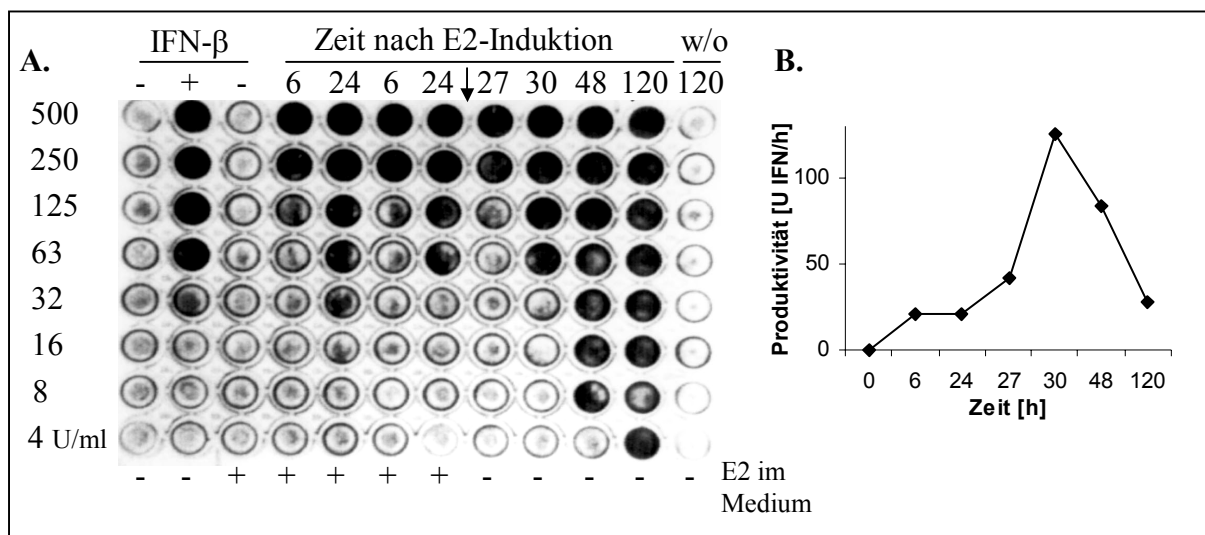


Abb. 24: Interferonproduktion nach Wegwaschen von Östrogen. (A) Interferon akkumulierte nach Östrogen (E2)-Induktion von KA1-10/96-1A-Zellen selbst nach Auswaschen des E2 nach 24 h (Pfeil) weiter. Die Zeitpunkte 6 h und 24 h wurden doppelt bestimmt. Unstimulierte Zellen (w/o) zeigten keine Interferonproduktion. E2 hatte keinen Effekt auf die Virusresistenz der L-M(TK⁻)-Zellen wie die 3. Spalte zeigt. Als Positivkontrolle wurde murines IFN- β (+) in den links angegebenen Konzentrationen verwendet. (B) Die Produktivität (Produktion pro Zeiteinheit) ist gezeigt. Das Maximum liegt zwischen 27 h und 30 h nach Stimulationsbeginn und 3 h bis 6 h nach Auswaschen des Östrogens.

2.3.3. Analyse und Inhibition von EGFR-vermittelten Signalwegen

Da eine transiente Stimulation des EGFRs nicht ausreichte, um die Zellen für eine Apoptoseauslösung durch nachfolgende IRF-1-Aktivierung zu sensibilisieren, scheint es wahrscheinlich, daß entweder kurzlebige oder aber frühe vom EGFR ausgelöste Signale mit einer IRF-1-Aktivität kooperieren. Aus der Reihe an direkt vom EGFR gesteuerten

Signalwegen wurde im folgenden versucht, diejenigen zu identifizieren, die für eine Kooperation mit IRF-1 notwendig sind.

2.3.3.1. Die Expression dominant negativer STAT-Isoformen blockiert den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod

Es war bekannt, daß die IRF-1/EGFR-vermittelte Apoptose durch die Expression einer dominant negativen STAT5-Variante (MORIGGL *et al.*, 1996) verhindert werden kann (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999 und Abbildung 27A). Dieser Variante, STAT5a- Δ 750, fehlt die Transaktivierungsdomäne. Sie wird zwar durch Rezeptorstimulation wie der Wildtyp Tyrosinphosphoryliert und bindet spezifisch Promotorelemente, kann aber die Transkription von Genen nicht aktivieren. Die Dephosphorylierung und das Ablösen von der DNA sind zeitlich stark verzögert. Der dominant negative Effekt beruht somit wahrscheinlich auf der Blockierung der DNA-Bindungsstellen in STAT5-responsiven Promotoren. Diese STAT5a-Variante wirkt auch gegenüber STAT5b dominant negativ (MORIGGL *et al.*, 1996).

Bindung von EGF an den EGFR bewirkt allerdings nicht nur die Aktivierung von STAT5, sondern auch die von STAT1 und STAT3. Das Gen von STAT1 ist zudem ein transkriptionelles Ziel von IRF-1 (NGUYEN *et al.*, 1997b; Abbildung 25A) und eine physische Interaktion von STAT1 und IRF-1 ist beschrieben (CHATTERJEE-KISHORE *et al.*, 2000). Deswegen wurde eine mögliche Beteiligung von STAT1 am IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod untersucht.

Zunächst wurde eine dominant-negative STAT1-Variante eingesetzt, STAT1-701, in der Tyrosin 701 zu Phenylalanin mutiert wurde, was die Tyrosin-Phosphorylierungsstelle zerstört und damit Dimerisierung verhindert (WALTER *et al.*, 1997). Da das Ablösen von STAT1 vom Rezeptor von der Phosphorylierung an Tyrosin 701 abhängig ist, ist der dominant negative Effekt vermutlich durch Blockierung der Bindungsstellen am Rezeptor begründet. Die Überexpression von STAT1-701 (Abbildung 25D) bewirkte ebenso wie die von STAT5- Δ 750 eine Verhinderung des IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltodes (Abbildung 25B).

Serin 727 von STAT1 liegt in einem Aminosäuresequenzmotiv, das der Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch MAP-Kinasen entspricht. Um zu prüfen, ob eine STAT1-Serin-Phosphorylierung notwendig ist für den Synergismus zwischen IRF-1 und EGFR, wurde eine Ser727Ala-Variante, STAT1-727, überexprimiert. Für STAT1-727 ist eine dominant negative Wirkung beschrieben. Es reduziert die Promotoraktivierung des Genes von ICAM-1 durch STAT1 nach Interferon- γ Stimulation (WALTER *et al.*, 1997). Ebenso wie

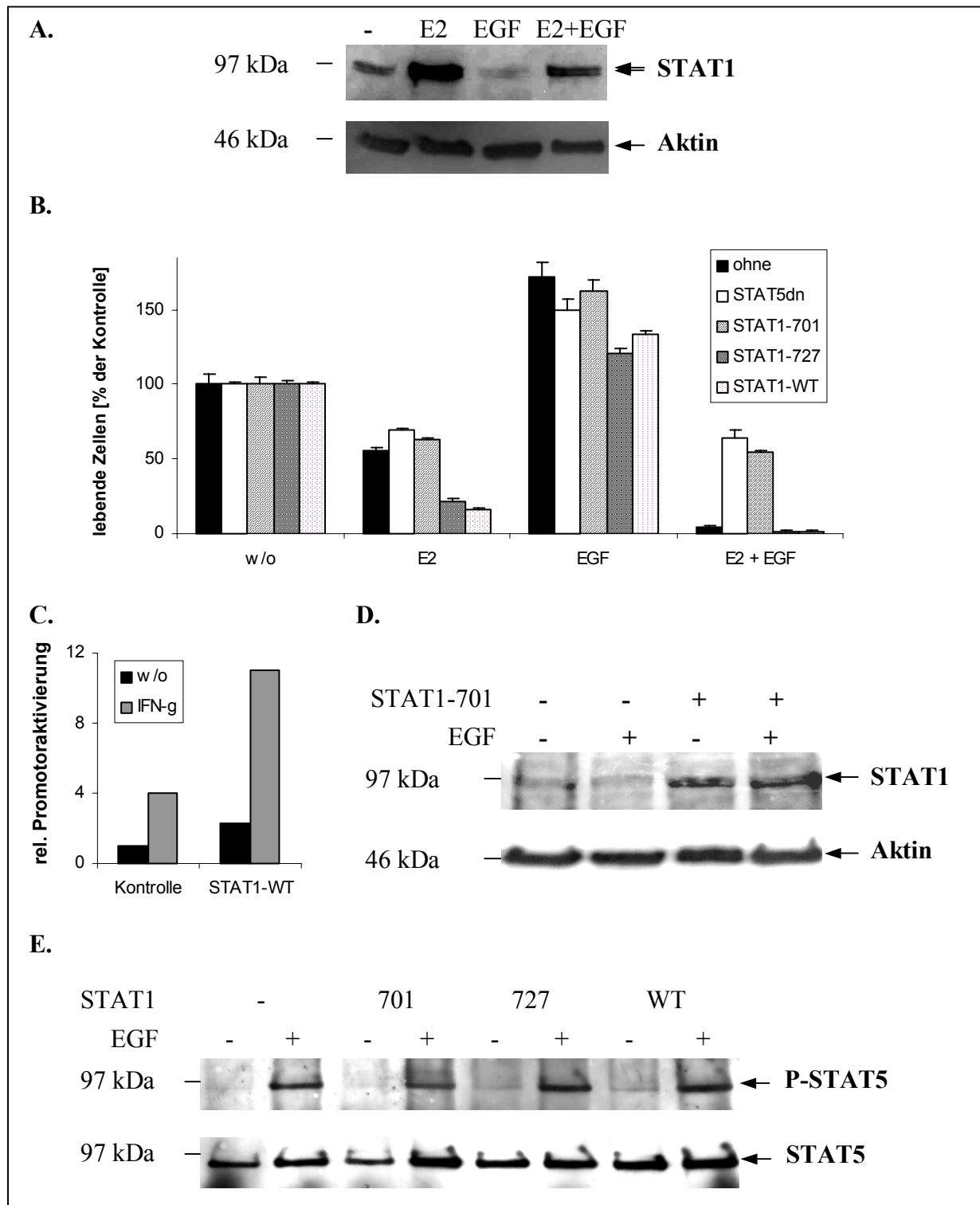


Abb. 25: Die Expression der dominant negativen Varianten STAT1-Tyr701Phe und STAT5 Δ 750 blockiert den synergistischen Zelltod von KA1-10/96-1A-Zellen. (A) Der Western Blot zeigt, daß die Expression des endogenen STAT1 durch IRF-1-Aktivierung (E2) erhöht wurde. Die Induktionszeit betrug 2 Tage. **(B)** Wildtyp-STAT1 oder dominant negative STAT1- und STAT5-Varianten wurden stabil exprimiert. Die Zellzahlen wurden nach 5 Tagen Induktion mit E2 und/oder EGF bestimmt. Die Zellzahl des unstimulierten Ansatzes wurde jeweils auf 100% gesetzt. **(C)** Der Reporter pGL2-CVX48 und das Plasmid pMPSVHEcat wurden transient in KA1-10/96-1A-Zellen (Kontrolle) und in KA1-10/96-1A-Zellen, die stabil Wildtyp-STAT1 überexprimierten (STAT1-WT), transfiziert. Die

Stimulation erfolgte mit 100 U/ml murinem Interferon- γ für 24 h. Die STAT1-Überexpression verstärkte die Induktion des Promotors von pGL2-CVX48 durch Bindung an das darin enthaltene GAS-Element. **(D)** Der Western Blot zeigt die STAT1-Expression in STAT1-Tyr701Phe-exprimierenden und Kontrollzellen. Die EGF-Induktion erfolgte für 1 h. **(E)** STAT5 wurde aus unstimulierten und für 1 h EGF-stimulierten Zellen immunpräzipitiert. Für den Western Blot wurde zunächst ein Phospho-Tyrosin-Antikörper und dann ein STAT5-Antikörper verwendet. Es handelte sich um die in (B) beschriebenen Zellen.

Wildtyp-STAT1 war STAT1-727 nicht in der Lage den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod zu inhibieren (Abbildung 25B). Vielmehr verstärkten diese beiden Proteine die IRF-1-induzierte Proliferationsreduktion. Eine Serin-Phosphorylierung von STAT1 ist folglich im Gegensatz zur Tyrosinphosphorylierung zur Vermittlung der Apoptose durch IRF-1/EGFR-Wirkung nicht notwendig.

STAT1-701 wirkt wahrscheinlich durch Blockierung der STAT1-Bindungsstellen an den Rezeptoren dominant negativ (WALTER *et al.*, 1997). Um auszuschliessen, daß die Wirkung der STAT1-701-Variante auf einer Inhibition der Kinaseaktivität des EGFRs oder auf der Blockierung der Bindungsstellen für andere STAT-Isotypen beruhte, wurde die Phosphorylierung von STAT5 nach EGF-Stimulation in Gegenwart von STAT1-Varianten untersucht. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT5 war nach einstündiger EGF-Induktion deutlich nachweisbar. Tatsächlich war das Ausmaß der Phosphorylierung in Gegenwart oder Abwesenheit der STAT1-Varianten vergleichbar (Abbildung 25E). Dies zeigt, daß der EGFR andere Signalwege trotz Expression von STAT1-701 anschalten konnte und daß STAT1-701 nicht die STAT5-Phosphorylierung verhinderte.

2.3.3.2. Die Beteiligung des MAP-Kinase-Signalweges

Die Aktivierung des EGFRs induziert neben dem STAT-Signalweg auch die MAP-Kinase-Kaskade. Die Phosphorylierung von ERK1/2 war eine halbe Stunde nach EGF-Gabe klar nachweisbar, hielt über mindestens drei Stunden an und war nach zwei Tagen selbst bei fortwährender EGF-Induktion nicht mehr nachweisbar (Abbildung 26 und nicht gezeigte Daten). Der Signalweg wurde nach einiger Zeit also abgeschaltet. Gleichzeitige Anwesenheit von EGF und Östrogen verstärkte die ERK1/2-Phosphorylierung nicht wesentlich im Vergleich zur alleinigen Gabe von EGF (Abbildung 26).

Es war bekannt, daß die Expression von dominant negativem Ras die IRF-1/EGFR-vermittelte Apoptose nicht blockiert (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Aufgrund von Querverbindungen zwischen den Signalwegen schien es aber trotzdem möglich, daß weiter unten im Signalweg liegende Proteine wie MEK oder ERK dabei eine Rolle spielten. Es

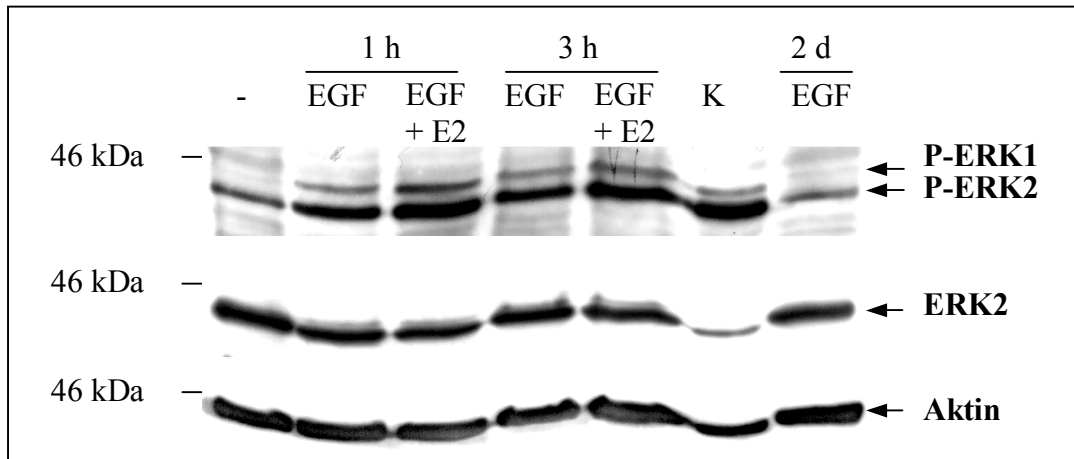
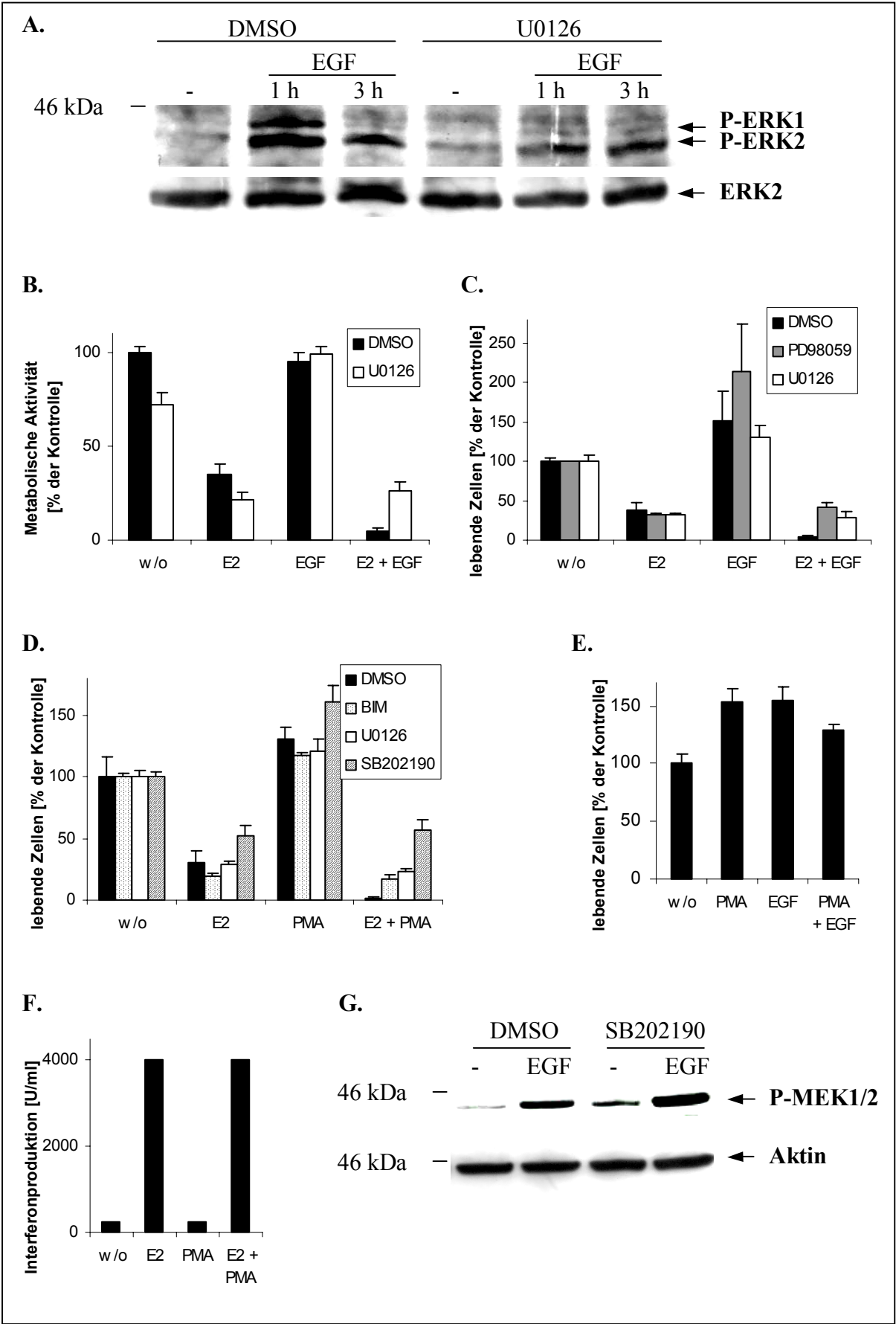


Abb. 26: Permanente EGF-Stimulation führt zu transienter ERK1/2-Phosphorylierung. Der Western Blot zeigt die ERK1/2-Phosphorylierung in KA1-10/96-1A-Zellen nach 1 h, 3 h und 2 Tagen EGF-Stimulation. Bei der Positivkontrolle (K) handelte es sich um EGF-stimuliertes A431-Lysat.

wurden die chemischen Verbindungen PD98059 und U0126 zur spezifischen Inhibition der Aktivierung von MEK1/2 eingesetzt. Tatsächlich unterbrach die Inhibition von MEK1/2 (Abbildung 27A) den Synergismus zwischen IRF-1 und EGFR-Aktivierung vollständig. Die metabolische Aktivität und die Zellzahlen bei gleichzeitiger EGF- und Östrogen-Behandlung waren in Gegenwart der MEK-Inhibitoren ähnlich denen der nur mit Östrogen behandelten Ansätze (Abbildungen 27B und 27C). Beide Inhibitoren behinderten nicht den Wachstumsschub, der durch EGF ausgelöst wurde. Der Proliferationsstimulus und die Sensibilisierung gegen die Wirkung von IRF-1 scheinen somit voneinander unabhängig realisiert zu werden.

Der MAP-Kinase-Weg wird auch durch andere Stimuli als EGF angeschaltet. So aktiviert z. B. der Phorbolester PMA den MAP-Kinase-Weg (Abbildung 27H) unterhalb von Ras über klassische und neue Isoformen der Proteinkinase C (CAI *et al.*, 1997). Die KA1-10/96-1A-Zellen zeigten nach PMA-Gabe eine erhöhte Proliferation, ähnlich dem Effekt von EGF. PMA war zudem in der Lage, EGF bei der Vermittlung des Zelltodes in Kombination mit IRF-1 zu ersetzen (Abbildung 27D, schwarze Balken). Es ist beschrieben, daß PMA in manchen Zelllinien endogenes IRF-1 induzieren kann (FUJITA *et al.*, 1989a). PMA-Stimulation führte jedoch im Gegensatz zur IRF-1-Aktivierung nicht zu Produktion von Interferon (Abbildung 27F). Die Kombination von EGF und PMA löste zudem keinen Zelltod aus (Abbildung 27E). Folglich ist es unwahrscheinlich, daß der IRF-1/PMA-vermittelte Zelltod auf eine erhöhte IRF-1-Aktivität zurückzuführen war. Stattdessen liegt der Schluß nahe, daß EGF und PMA die gleichen, für den synergistischen Zelltod mit IRF-1 verantwortlichen Signalwege anschalten.



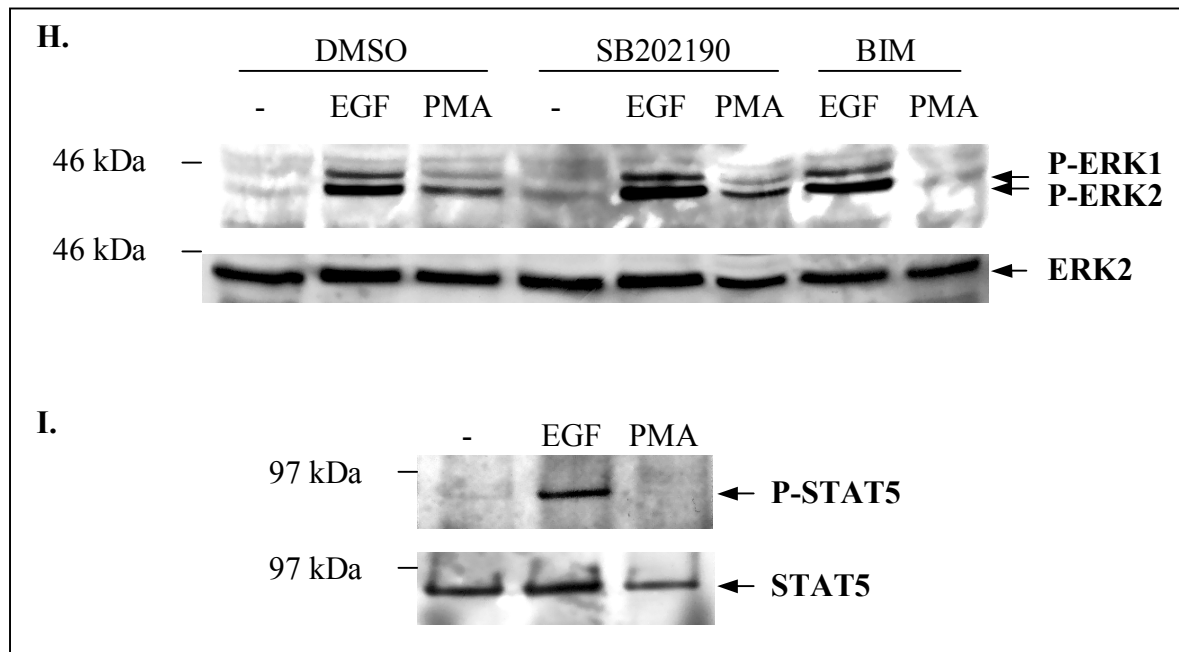


Abb. 27: Der MAP-Kinase-Signalweg ist essentiell bei der Vermittlung des synergistischen Zelltodes in KA1-10/96-1A-Zellen. (A) Der MEK1/2-Inhibitor U0126 unterdrückt die ERK1/2-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation. DMSO ist das Lösungsmittel für U0126. (B) Die metabolische Aktivität von Zellen, die mit Östrogen (E2) und/oder EGF in Gegenwart oder Abwesenheit von U0126 für 3 Tage stimuliert wurden, wurde mithilfe des WST-Zellproliferationsassays bestimmt. (C) Die Anzahl lebender Zellen nach 5 Tagen Induktion mit E2 und/oder EGF in Gegenwart von DMSO oder der MEK-Inhibitoren PD98059 bzw. U0126 wurde bestimmt. Die Zellzahl der unstimulierten Probe wurde jeweils auf 100% gesetzt. (D) Der Phorbolöster PMA wurde statt EGF in Kombination mit IRF-1 verwendet. Die Zellzahlen nach 5 Tagen Kultivierung mit dem PKC-Inhibitor BIM, dem p38-Inhibitor SB202190 oder dem Lösungsmittel DMSO sind gezeigt. Auch hier wurde die unstimulierte Kontrolle jeweils auf 100% gesetzt. (E) Die Zellzahlen nach 5 Tagen EGF- und/oder PMA-Induktion sind gezeigt. (F) Die Interferonmenge im Überstand von Zellen, die für 3 Tage mit E2 und/oder PMA induziert wurden, wurde bestimmt. (G) Der Western Blot zeigt die Phosphorylierung von MEK1/2 nach 1 h EGF-Induktion in Gegenwart von SB202190 bzw. des Lösungsmittels DMSO. (H) Der Western Blot zeigt die ERK1/2-Phosphorylierung nach EGF- bzw. PMA-Stimulation für 1 h in Gegenwart von DMSO, SB202190 oder BIM. (I) STAT5 wurde nach 1 h EGF- bzw. PMA-Stimulation immunpräzipitiert und wie in Abb. 25E beschrieben detektiert.

Um den IRF-1/PMA-vermittelten Zelltod mit dem IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod zu vergleichen, wurde der MAP-Kinase-Weg im PMA-Signal blockiert. Die Zellen überlebten die gleichzeitige Stimulation mit Östrogen und PMA in Anwesenheit des MEK-Inhibitors U0126. Dies ist analog zur Inhibition des IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltodes durch U0126. Das Bisindolylylmalimid (BIM) GF109203X ist ein spezifischer Inhibitor der Proteinkinase C, der durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle in PKCs wirkt (TOULLEC *et al.*, 1991). SB202190 ist ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP-Kinase. BIM und SB202190 waren jeweils in der Lage, den PMA/IRF-1-vermittelten Zelltod annähernd vollständig aufzuheben,

während der IRF-1/EGFR-vermittelte Zelltod von beiden lediglich unvollständig gehemmt wurde (Abbildung 27D und nicht gezeigte Daten). Da weder die ERK1/2- noch die MEK1/2-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation durch die Gegenwart von SB202190 inhibiert wurde (Abbildungen 28G und 28H), kann eine unspezifische Wirkung des p38-Inhibitors auf MEK und ERK ausgeschlossen werden. BIM blockierte erwartungsgemäß die ERK-1/2-Phosphorylierung nach PMA-, nicht aber nach EGF-Stimulation (Abbildung 27H).

Im Gegensatz zur EGFR-Aktivierung induzierte PMA keine Phosphorylierung von STAT5 (Abbildung 27I). Dies läßt vermuten, daß direkte Aktivierung des STAT-Signalweges verzichtbar ist für den IRF-1/PMA-vermittelten Zelltod.

2.3.4. Interaktionen zwischen den STAT- und MAP-Kinase-Signalwegen

Da sowohl MEK-Aktivität als auch funktionelle STAT-Signalwege zur Vermittlung des IRF-1/EGFR-induzierten Zelltodes notwendig waren, stellte sich die Frage, ob diese beiden Wege unabhängig voneinander benötigt werden oder ob die Aktivierung des einen Weges die des anderen beeinflusst.

Zunächst wurde nach einem Einfluß des MAP-Kinase-Weges auf den STAT-Weg gesucht. Eine Modulation des Transaktivierungspotentials von STAT-Proteinen durch MAP-Kinasen kann durch Serin-Phosphorylierung erfolgen (KOVARIK *et al.*, 1999). Da aber die Expression einer in ihrer Serin-Phosphorylierungsstelle mutierten und dominant negativ wirkenden STAT1-Variante keinen Effekt auf den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod zeigte (Abbildung 25B), konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Tyrosin-Phosphorylierung der STATs. STAT5 wurde jedoch nach EGF-Gabe ungeachtet der Gegenwart von U0126 Tyrosin-phosphoryliert (Abbildung 28).

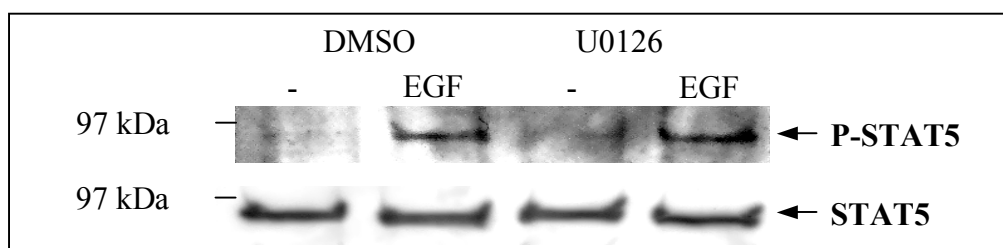


Abb. 28: Der MEK1/2-Inhibitor U0126 hat keinen Einfluß auf die STAT5-Phosphorylierung. Die STAT5-Phosphorylierung nach 1 h EGF-Behandlung in Gegenwart von U0126 oder dem Lösungsmittel DMSO wurde wie in Abb. 25E beschrieben detektiert.

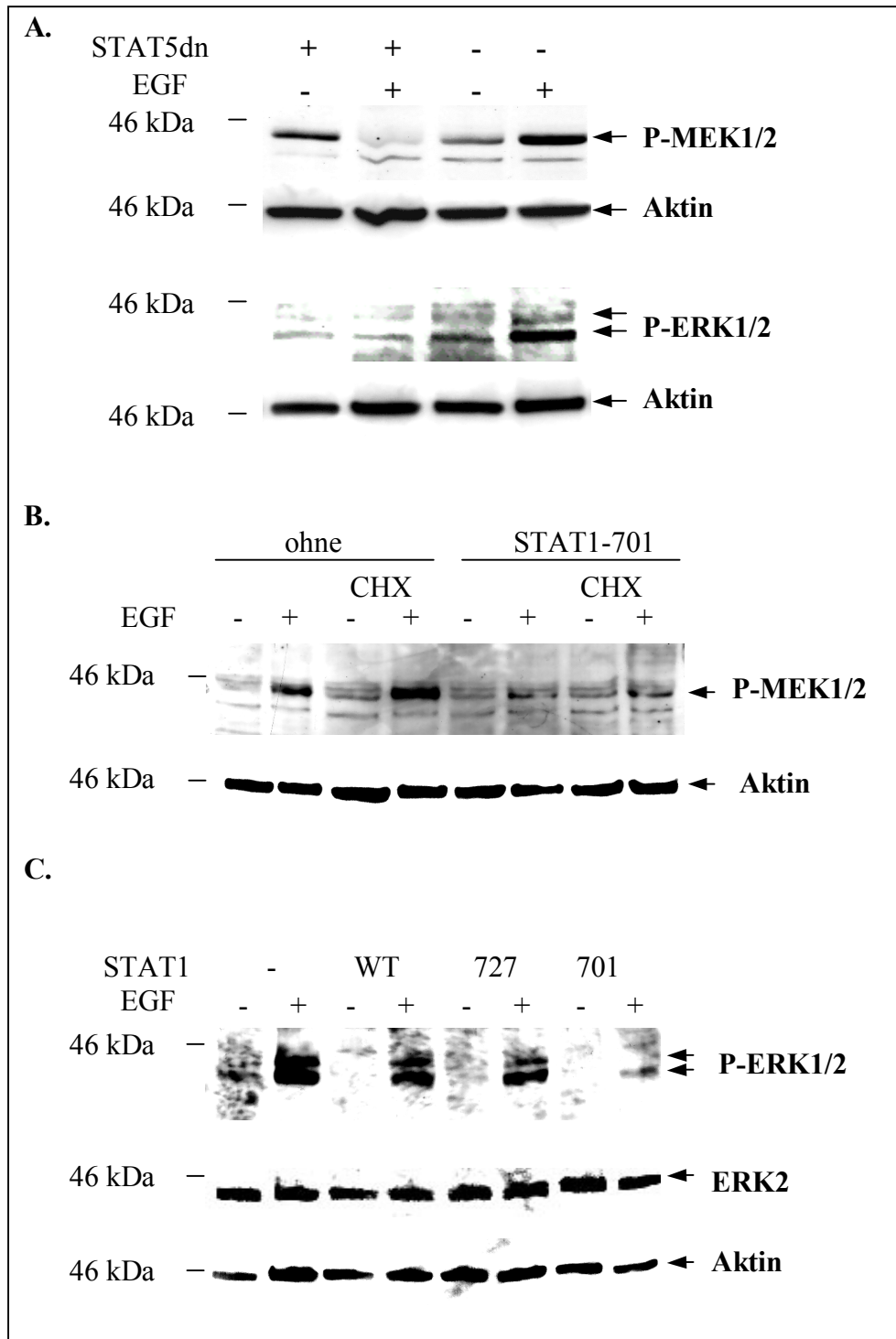


Abb. 29: Die MEK- und ERK-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation wird durch die Expression dominant negativer STAT-Varianten in KA1-10/96-1A-Zellen verhindert. (A) Die ERK1/2- und die MEK1/2-Phosphorylierung nach 1 h EGF-Stimulation in Kontrollzellen und STAT5 Δ 750 stabil exprimierenden Zellen wurde durch Western Blot gezeigt. Die Unterschiede im Ausmaß der MEK-Phosphorylierung zwischen unbehandelten Kontrollzellen und Zellen, die die STAT5-Variante exprimieren, waren nicht signifikant wie eine Wiederholung des Blots mit unabhängigen Proben ergab. (B) Die MEK1/2-Phosphorylierung nach 1 h EGF-Stimulation wurde in Kontrollzellen und stabil STAT1-701 exprimierenden Zellen bestimmt. In Parallelansätzen wurde Cycloheximid (CHX) zugesetzt. (C) Die ERK1/2-Phosphorylierung nach 2 h EGF-Stimulation in Zellen, die die angezeigten STAT1-Varianten stabil exprimierten, zeigt dieser Western Blot.

Umgekehrt war ein direkter Einfluß von STAT auf den MAP-Kinase-Weg in der EGFR-Signaltransduktion bisher nicht bekannt. In diesem System verhinderte nun die Expression von dominant negativem STAT5 die Phosphorylierung von MEK1/2 und deren Substratproteinen ERK1/2 nach EGF-Stimulation (Abbildung 29A). Ebenso war die MEK1/2- und ERK1/2-Phosphorylierung nach EGF-Gabe in Zellen, die STAT1-701 exprimierten, verhindert (Abbildung 29B und 29C). Wildtyp STAT1 und STAT1-727 zeigten hingegen die erwartete ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 29C). Die Blockierung der MEK1/2-Phosphorylierung nach EGF-Behandlung durch STAT1-701 trat auch in Gegenwart des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid auf (Abbildung 29B).

Faßt man die bisherigen Beobachtungen zusammen, so korreliert die Induktion des IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltodes konsistenterweise mit der Phosphorylierung von MEK nach EGF-Stimulation.

2.3.5. IRF-1 kooperiert mit MEK bei der Auslösung des Zelltodes in verschiedenen Zelllinien

Um die vermutete zentrale Rolle von MEK bei der Auslösung der Apoptose durch synergistische Wirkung von IRF-1 und EGFR zu bestätigen, wurden dazu Versuche in zwei weiteren Zelllinien gemacht. Im Hinblick auf die Entwicklung einer Tumorthherapie wurde zunächst die humane Zelllinie SiHa gewählt, die aus einem Gebärmutterhals-Karzinom isoliert wurde. SiHa-Zellen exprimieren von Natur aus den EGFR und reagieren auf EGF-Behandlung wie die Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte (Abbildung 30B). In diese Zelllinie wurde der Vektor pIRF-1-hERneo stabil transfiziert, der in Kapitel 2.1.2 beschrieben ist. Die Aktivierung von IRF-1 zeigte einen vergleichbar geringen Effekt auf die Proliferation der SiHa-Zellen. Gleichzeitige Aktivierung von IRF-1 und EGFR führte auch in diesem System zu einer synergistischen Verringerung der Zellzahlen, die die durch IRF-1-Aktivierung verursachte Wirkung sehr deutlich übertraf (Abbildung 30A). Das Zeitintervall der Aktivierung, das notwendig war, um diesen Effekt zu bewirken war allerdings länger als beim vorher beschriebenen NIH3T3-System. Der Synergismus von IRF-1 und EGFR in SiHa-Zellen konnte durch die Inhibition der MEK-Aktivität reduziert werden (Abbildung 30). Im Gegensatz zum NIH3T3-System konnte allerdings keine vollständige Aufhebung des Synergismus erreicht werden, obwohl die ERK-Phosphorylierung vollständig aufgehoben war.

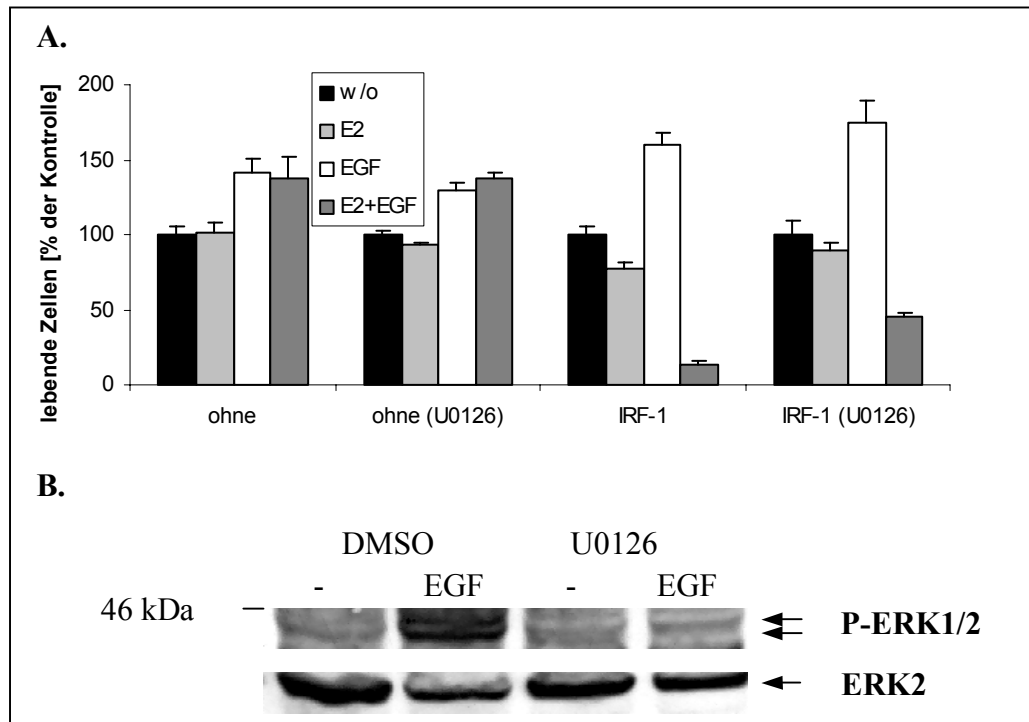


Abb. 30: Die humane SiHa-Zelllinie zeigt Synergismus zwischen IRF-1 und EGFR. (A) Untransfizierte (ohne) und stabil IRF-1-hER exprimierende (IRF-1) Zellen wurden mit Östrogen (E2) und/oder EGF und in Gegenwart oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors U0126 14 Tage kultiviert. Die Zellzahl der uninduzierten Probe wurde jeweils auf 100% gesetzt. **(B)** ERK1/2-Phosphorylierung nach 1 h EGF-Stimulation in Gegenwart von DMSO oder U0126 wurde durch Western Blot bestimmt.

Die humane Fibrosarcoma-Zelllinie 2fTGH exprimiert ein mutiertes Ras-Protein (BROWN *et al.*, 1984; WEN *et al.*, 1995). Aus diesem Grund zeigt diese Zelllinie eine konstitutive MEK-Aktivierung, die unabhängig von einer EGFR- oder STAT-Aktivierung ist. STAT5 ist in diesen Zellen auch tatsächlich nicht in signifikantem Maße konstitutiv aktiviert (Abbildung 32). Nach stabiler Etablierung des IRF-1-hER-Fusionsproteins in die 2fTGH-Zellen, reagierten diese auf die Behandlung mit Östrogen mit einer bemerkenswert hohen Wachstumsreduktion; die Zellzahl betrug weniger als 5% der unbehandelten Kontrolle nach sieben Tagen IRF-1-Aktivierung (Abbildung 31A, weiße Balken). Die Vermutung lag nahe, daß hier bereits ein kooperativer Effekt von MEK und IRF-1 zugrundelag. Die Inhibition der MEK-Aktivität durch U0126 verhinderte den Effekt in Konzentrations-abhängiger Weise und hob die Zellzahl nach Östrogenbehandlung graduell auf bis zu 35% an (Abbildung 31A). Selbst bei der höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration (10 μ M) war die konstitutive ERK1/2-Aktivierung nur teilweise unterdrückt (Abbildung 31B). Um zu prüfen, ob weitere EGFR-Signale außer dem MAPK-Weg notwendig waren, um den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod auszulösen, wurde der EGFR stabil in IRF-1-exprimierende Einzelklone transfiziert. Eine weitere Reduktion der Zellzahlen durch kombinierte Östrogen /EGF-Gabe über das

durch Östrogen alleine bewirkte Maß konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 33). Folglich scheinen weitere EGFR-gesteuerte Signale außer dem MAPK-Weg nicht darüberhinaus mit IRF-1 in der Zelltod-Vermittlung zu kooperieren.

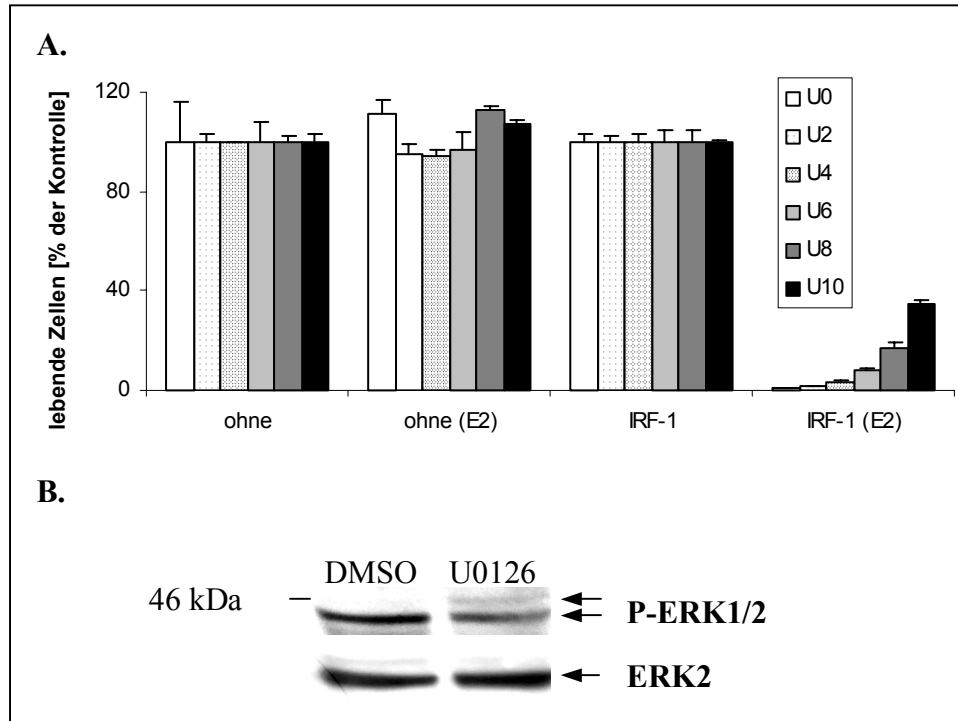


Abb. 31: Der Einfluß von IRF-1 auf die Proliferation von 2fTGH-Zellen kann durch Inhibition der MEK-Aktivität partiell revertiert werden. (A) Untransfizierte (ohne) und stabil IRF-1-hER exprimierende Zellen wurden mit Östrogen (E2) und/oder EGF und in Gegenwart oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors U0126 7 Tage kultiviert. Die Konzentration von U0126 (U) betrug zwischen 0 und 10 μ M (U0 bis U10). Die Zellzahl der uninduzierten Probe wurde jeweils auf 100% gesetzt. (B) ERK1/2-Phosphorylierung in Gegenwart von DMSO oder U0126 wurde durch Western Blot bestimmt.

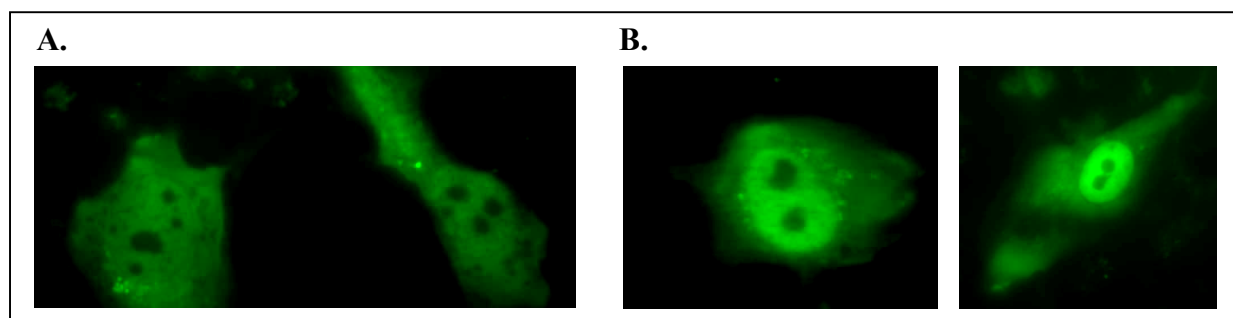


Abb. 32: STAT5 ist in 2fTGH-Zellen nicht konstitutiv aktiviert. Die Zellen wurden transient mit pcDNA3-hEGFR und pMBC-STAT5aGFP transfiziert. (A) Ohne Stimulation war STAT5 gleichmäßig im Kern und im Cytoplasma verteilt. (B) Nach 30 min EGF-Stimulation akkumulierte STAT5 im Kern.

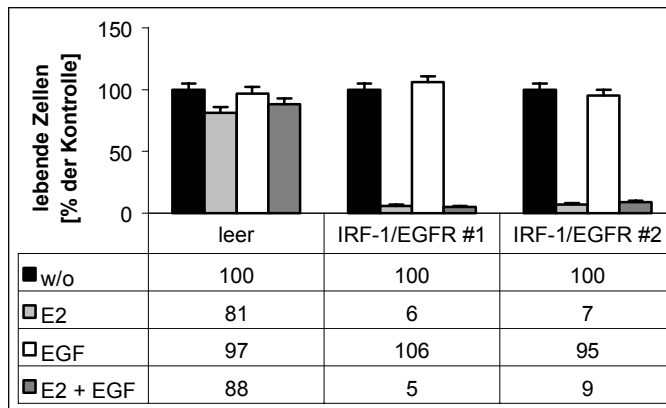


Abb. 33: EGF kann den Einfluß von IRF-1 auf die Proliferation von 2fTGH-Zellen nicht weiter verstärken. Zwei voneinander unabhängige stabil IRF-1-hER und EGFR exprimierende Einzelklone (IRF-1/EGFR#1 und #2) sowie untransfizierte Zellen (leer) wurden für 7 Tage mit Östrogen (E2) und/oder EGF behandelt. Die Zellzahl der unbehandelten Proben wurde jeweils auf 100% gesetzt.

2.3.6. H-rev107 wird direkt durch IRF-1 induziert

H-rev107 ist ein antiproliferativ wirkendes Protein, daß durch seine differentielle Expression in Ras-transformierten versus revertierten Zelllinien entdeckt wurde (siehe Kapitel 1.1.2.1). Es wird durch Interferon- γ transkriptionell induziert. Da IRF-1 eines der Zielgene von Interferon- γ ist, stellte sich die Frage, ob H-rev107 eben durch IRF-1 induziert werden kann. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Sers, Charité, Berlin wurde diese Hypothese unter Zuhilfenahme der IRF-1-hER-exprimierenden Zelllinie KA1-10/96-1A geprüft. Eine Northern Blot-Analyse zeigte, daß die Aktivierung von IRF-1 selbst in Gegenwart des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid eine H-rev107-mRNA induzierte (Abbildung 34).

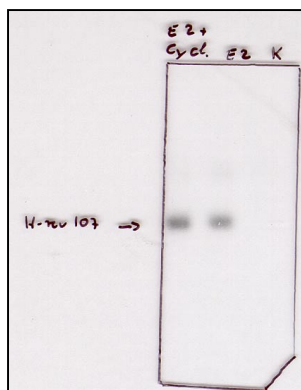


Abb. 34: Die mRNA von H-rev107 wird durch IRF-1 induziert. KA1-10/96-1A-Zellen wurden für 24 h mit Östrogen (E2) mit/ohne Cycloheximid kultiviert. K ist die unbehandelte Kontrolle. Die Banden zeigen die H-rev107 mRNA. Dieser Northern Blot wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Sers, Charité, Berlin angefertigt.

Das die IRF-1-Aktivierung tatsächlich zur Expression des H-rev107-Proteins in den KA1-10/96-1A-Zellen führt, wurde daraufhin durch Western Blot bestätigt (Abbildung 35).

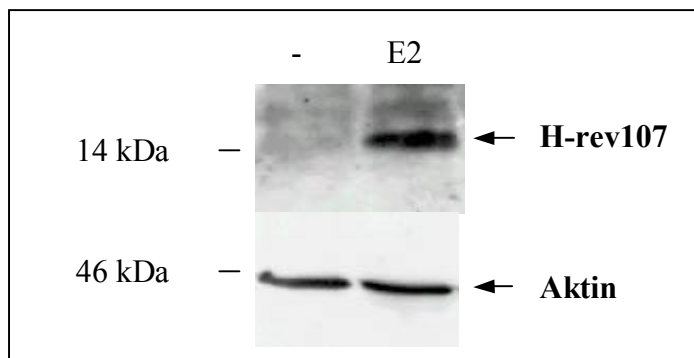


Abb. 35: Das H-rev107-Protein kann durch IRF-1 induziert werden. KA1-10/96-1A-Zellen wurden für 2 Tage mit Östrogen (E2) behandelt. Der Western Blot zeigt das H-rev107-Protein.

Da die Expression von H-rev107 und die Aktivität von Ras in einem reziproken Verhältnis stehen und da H-rev107 durch IRF-1 induziert wird und Ras durch den EGFR aktiviert wird, lag die Frage nahe, ob H-rev107 beim IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod eine Rolle spielt. Wenn dies der Fall wäre, könnte es entweder notwendig oder hinreichend für die Kooperation mit den EGFR-Signalen sein. Eine konstitutive stabile Überexpression von H-rev107 war in den KA1-10/96-1A-Zellen nicht möglich, da die Transfektion nicht zur Bildung stabil exprimierender Klone führte. Um dennoch eine mögliche hinreichende Rolle von H-rev107 beim IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod zu prüfen, wurde ein Expressionplasmid für H-rev107 (SERS *et al.*, 1997) zusammen mit einem GFP-kodierenden Plasmid in die KA1-10/96-1A-Zellen transfiziert. Die leuchtenden Zellen wurden per FACS aus der Mischung separiert. Diese Zellen sollten mit großer Wahrscheinlichkeit H-rev107 exprimieren, da das Verhältnis von H-rev107- zum GFP-Plasmid 3 zu 1 betrug. Direkt anschließende Stimulation mit EGF für 5 Tage ergab allerdings im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen keine Erniedrigung der Zellzahlen (Abbildung 36). Es wurde zudem keine Verlangsamung des Wachstums der mit H-rev107-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Setzt man voraus, daß H-rev107 tatsächlich und ausreichend lange exprimiert wurde, so legt dies nahe, daß H-rev107 die Funktion von IRF-1 in der Kooperation mit dem EGFR nicht ersetzen kann. Über eine notwendige Funktion von H-rev107 in der IRF-1/EGFR-vermittelten Apoptose läßt sich allerdings an dieser Stelle keine Aussage machen.

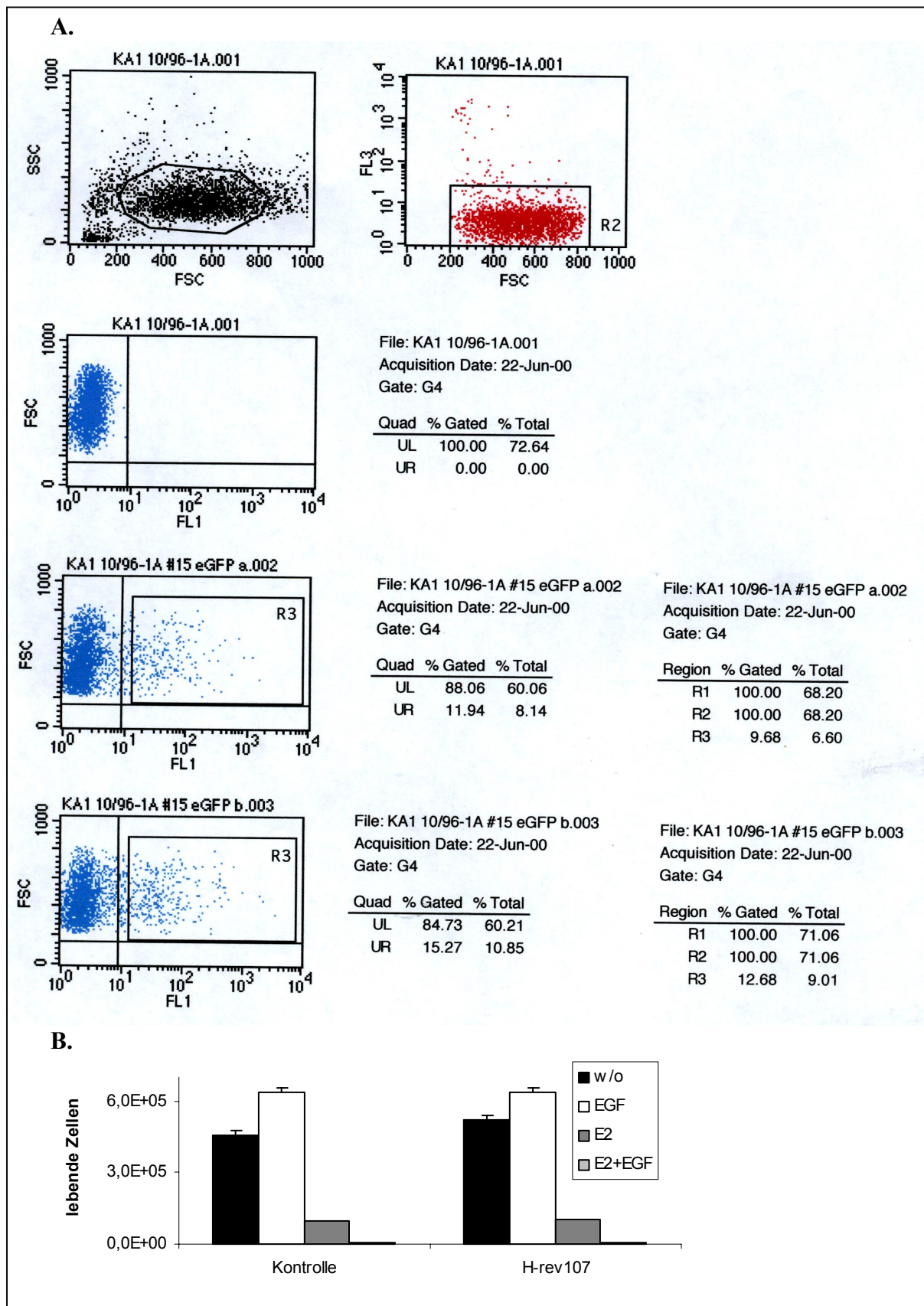


Abb. 36: Exogene H-rev107-Expression in KA1-10/96-1A-Zellen. (A) Untransfizierte Zellen (obere Reihe) und mit einem eGFP-Expressionsplasmid sowie entweder einem leeren Vektor(mittlere Reihe) oder einem H-rev107-kodierenden Plasmid (untere Reihe) transient transfizierte Zellen wurden durch FACS nach fluoreszierenden Zellen sortiert. (B) Diese Zellen wurden anschließend für 5 Tagen mit EGF und/oder Östrogen (E2) kultiviert.

III. Diskussion

3.1. Die IRF-1-hER-Fusionsproteine zur Selektion hochexprimierender Zellklone

Bei der Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen stellen sich zwei wesentliche, mit der gentechnischen Veränderung verbundene Probleme. Zum einen ist es schwierig und zeitaufwendig, aus einer Mischung von transfizierten Zellen diejenigen zu isolieren, die große Mengen des Proteins produzieren. Zum anderen bewirkt die genetische Drift innerhalb einer Zellpopulation, daß die Expression des Proteins über längere Zeit sinkt bzw. verschwindet. Am Beispiel des IRF-1-hER-Fusionsproteins wurden deshalb zwei Ansätze verfolgt, diese Probleme zu umgehen.

Zunächst wurde das enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) in das Protein integriert. Die Funktion von IRF-1-hER wird hierdurch nicht wesentlich beeinflußt. Dieses neue Protein ermöglicht die Beobachtung seiner Lokalisation innerhalb der Zelle. Insbesondere kann nach Östrogenstimulation die Translokation vom Cytoplasma in den Nukleus und somit die Kinetik der Aktivierung von IRF-1 beobachtet werden. Die eGFP-Fusion erlaubt zudem die Selektion stark leuchtender Zellen durch FACS-Sortierung. Da es sich um ein einzelnes Protein handelt, ist die Expressionshöhe von eGFP und IRF-1 gleich. Somit ist die Selektion hochexprimierender Zellen leicht und zeitsparend durch FACS-Sortierung möglich. Aus Populationen, in denen durch genetische Drift exprimierende und nicht-exprimierende Zellen vorhanden sind, lassen sich insbesondere die Exprimierer heraussortieren.

In einem zweiten Ansatz wurde das Gen für die Neomycinphosphotransferase ohne sein ATG-Kodon zusammen mit einem SECIS-Element 3' hinter das Stop-Kodon des Genes für IRF-1-hER kloniert. Von der RNA, die von diesem Plasmid transkribiert wird, wird in 99,7% der Fälle das IRF-1-hER-Protein translatiert. In 0,3% der Fälle bewirkt das SECIS-Element ein Überlesen des Stop-Kodons und es entsteht ein Fusionsprotein aus IRF-1-hER und der Neomycinphosphotransferase. Dieses System stellt eine Alternative zum üblichen Kotransfer dar, bei dem das gewünschte Protein und der Resistenzmarker von zwei verschiedenen Plasmiden kodiert wird. Ein Vergleich stabil transfizierter NIH3T3-Zellen zeigt, daß die Fusion mit der Neomycinphosphotransferase bei hohem Selektionsdruck dem Kotransfer überlegen ist. Sowohl die Klonmischungen wie alle individuelle Klone zeigten stärkere Wachstumsinhibition und durchschnittlich höhere Interferonproduktion nach Anschalten von IRF-1. Während unter den durch Kotransfer erhaltenen Zellklonen solche waren, die

offensichtlich kein oder sehr wenig IRF-1 exprimierten und trotzdem gegenüber der Selektionsdroge resistent waren, zeigten sämtliche durch die Fusion erhaltenen Einzelklone IRF-1-Aktivität. Die Neomycinphosphotransferase-Fusion ist also geeignet, um Klonmischungen zu erhalten, die ein relativ hohes Expressionsniveau des gewünschten Proteins zeigen. Die Expression sollte zudem stabilisiert sein, da das Resistenzmarkergen eng an das Gen des gewünschten Proteins gekoppelt ist.

Eine Kombination der eGFP- und der Neomycinphosphotransferase-Fusion schien deshalb ein optimales System zur Isolierung hochproduzierender Säugerzellen. Ein Vergleich zwischen den Neomycinphosphotransferasefusionen von IRF-1-hER und IRF-1-eGFP-hER zeigt jedoch, daß die Integration von eGFP einen störenden Einfluß ausübt. Sowohl stabile NIH3T3-Klonmischungen als auch individuelle Zellklone zeigten durchschnittlich weniger IRF-1-Aktivität, wenn sie mit dem eGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen pIRF-1-hERneo und pIRF-1-GFP-hERneo in transienten Tests festgestellt werden konnten, ist es wahrscheinlich, daß dieser Effekt während des Selektionsprozesses und/oder durch eine verminderte Stabilität der Expression zustande kommt. Eine Erklärung wäre, daß die Integration von eGFP zwischen IRF-1 und den Östrogenrezeptorteil die Unterdrückung der IRF-1-Aktivität im uninduzierten Zustand durch sterische Hinderung nur unvollständig möglich macht. Eine daraus resultierende basale IRF-1-Aktivität könnte bei hoher Expression einen schädigenden Einfluß auf die Zellen ausüben. Somit würden nach einiger Zeit die Hochexprimierer verschwinden. Da bis zur Isolierung individueller Klone eine Kultivierung von etwa ein bis zwei Wochen nach der Transfektion nötig ist, könnte dies tatsächlich geschehen sein. Es ist aber auch denkbar, daß die beobachteten Unterschiede zwischen den mit pIRF-1-hERneo und den mit pIRF-1-GFP-hERneo transfizierten Zellen bezüglich der Wachstumsinhibition und Interferonproduktion gar nicht auf Unterschiede in der Expressionshöhe zurückzuführen sind. Diese IRF-1-Aktivitäten werden durch Bindung von IRF-1 an bestimmte Promotoren und Transkriptionsaktivierung vermittelt. Die Aktivierung eines synthetischen, IRF-1-Bindungsstellen enthaltenden Promotors zeigt in der transienten Transfektion keine Unterschiede zwischen IRF-1-hER und IRF-1-eGFP-hER. Natürliche Promotoren werden jedoch meist durch kooperative Bindung mehrerer Transkriptionsfaktoren aktiviert. Es ist also denkbar, daß die Integration von eGFP in IRF-1-hER die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren in unmittelbarer Nähe zur IRF-1-Bindungsstelle stört. Somit würde geringere Gentranskription, nicht aber eine niedrigere IRF-1-Expression zu geringerer Wachstumsinhibition und Interferonproduktion führen.

Damit stellt die Kopplung der Neomycinphosphotransferase oder eines anderen Resistenzmarkergens unter Entfernung des ATG-Kodons mit dem gewünschten Gen nicht nur eine alternative, sondern eine überlegene Methode bei der Expression von Proteinen in Säugerzellen dar. Die Integration von fluoreszierenden Proteinen in ein Gesamtprotein scheint hingegen nicht unproblematisch. Sie ist dennoch unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Bedenken für Beobachtungen wie z. B. der Kinetik der Translokation eines Proteins innerhalb der Zelle geeignet.

3.2. Proliferationskontrolle durch IRF-1 in Stromazellen

Das wachstumsinhibitorische Potential von IRF-1 wurde im zweiten Teil dieser Arbeit dazu benutzt, eine alternative Möglichkeit zur Bestrahlung zu entwickeln, mit der die Proliferation von Helferzellen bei der Kokultur mit Stammzellen reguliert werden kann. Beispielhaft wurde die humane Stromazelllinie L88/5 gewählt, die einen positiven Einfluß auf die Erhaltung eines wenig differenzierten Status` hämatopoetischer Stammzellen während der *ex vivo*-Kultivierung ausübt. Die Isolierung eines regulierten Zellklons nach Transfektion von L88/5-Zellen mit IRF-1-hER zeigte, daß diese Zellen nicht nur über längere Zeiträume in ihrem Wachstum inhibiert werden können. Ein 24 h Östrogen-Puls reicht zudem schon aus, um anhaltende Proliferationsreduktion von über einer Woche zu erreichen. Dadurch ist die Anwesenheit von Östrogen bei der Kokultur nicht notwendig und die Prozedur kann unter den gleichen Bedingungen erfolgen, wie auch bei der vorherigen Bestrahlung der Stromazellen. Tatsächlich sind IRF-1-regulierte Stromazellen in der Oberflächenmarkerexpression, der Cytokinproduktion, sowie in der Unterstützung von Stammzellen den bestrahlten Zellen mindestens gleichwertig. Die genetische Wachstumsregulation bietet darüberhinaus einige Vorteile gegenüber der herkömmlichen Bestrahlung. Durch IRF-1-Aktivierung proliferationsarretierte Stromazellen zeigen im Gegensatz zu bestrahlten Zellen eine hohe Viabilität und sind fest an der Gefäßoberfläche adhäriert. Zudem ist durch Variation der Östrogenkonzentration eine Feinregulation des Stromazellwachstums möglich. Weiterhin ist es bei diesem neuen System auch möglich, die Proliferation der Stromazellen während der Kokultivierung durch Zugabe von Östrogen zu regulieren. Ein Vorteil, der bei der Kultivierung in technischen Systemen zum Tragen kommen kann. Da hämatopoetische Zellen keinen Östrogenrezeptor exprimieren und Steroide schon in Langzeit-Knochenmark-Kokulturen eingesetzt wurden (CLAUSEN *et al.*, 2000), scheint ein störender Einfluß von

Östrogen bei der Kokultur unwahrscheinlich. Er kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

IRF-1 ist ein Transkriptionsaktivator. Es ist beschrieben, daß IRF-1 die Proteinproduktion in BHK21-Zellen, die das entsprechende Gen unter einem IRF-1-responsiven Promotor tragen, steigern kann (GESERICK *et al.*, 2000). In diesen Zellen führt die IRF-1-Aktivierung zu einem Wachstumsstop, der mit einer erhöhten IgG-Produktion gekoppelt ist. Verschiedene Autoren haben durch genetische Manipulation Stromazellen entwickelt, die hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF, Il-3 oder SCF überproduzieren, um so die Anzahl hämatopoetischer Zellen in Kokulturen zu steigern (HOGGE *et al.*, 1996; ZIPORI und LEE, 1988). Zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen scheint es nun möglich, Stromazellen zu entwickeln, die durch IRF-1 in ihrem Wachstum reguliert werden können und zudem gewünschte, für die hämatopoetischen Stammzellen vorteilhafte Cytokine produzieren.

Die gezeigten Ergebnisse demonstrieren, daß ein genetisches Wachstumsregulationssystem in Helferzellen eine Alternative zur herkömmlichen Bestrahlung bietet, die die entscheidenden phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der Parentalzellen unbeeinflusst läßt. Obwohl die Kapazität der IRF-1-regulierten Stromazellen zur Unterstützung hämatopoetischer Stammzellen in Kokulturen noch in weiteren Experimenten, insbesondere Langzeitkultur- und Repopulationstests in Mäusen, endgültig zu beweisen bleibt, zeigen die bisherigen Daten ein großes Applikationspotential auf. Nicht nur können diese Zellen für Studien über spezifische Interaktionen zwischen Stromazellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen verwendet werden. Auch für klinische Anwendungen, die die Verwendung von humanen Helferzellen erfordern, ist eine unproblematische Wachstumsregulation von Interesse. Insbesondere für die Entwicklung von Gewebe- und Organkulturen besteht die Notwendigkeit der Bereitstellung neuer Helferzelllinien, die Vorläuferzellen in definierte Differenzierungswege lenken. Damit eröffnet sich ein weites Anwendungsgebiet für das IRF-1-gesteuerte Wachstumsregulationssystem zur Vermeidung übermäßiger Proliferation von Helferzellen und regulierter Expression rekombinanter Differenzierungs- und überlebensnotwendiger Faktoren.

3.3. Apoptoseinduktion durch Synergismus von IRF-1 und EGFR

Während IRF-1 in untransformierten Zellen die Proliferation verlangsamt, bewirkt es in transformierten Zellen die Aktivierung eines Selbstmordprogramms. Die Kooperation von

IRF-1 mit dem EGFR in der Apoptoseauslösung wurde im Hinblick auf die Entwicklung einer Tumorthherapie im dritten Teil dieser Arbeit untersucht.

Wie aktiviert der EGFR einen minimalen CMV-Promotor und ist es wahrscheinlich, daß der Zelltod durch gemeinsame Bindung von IRF-1 und EGFR-aktivierten Transkriptionsfaktoren an bestimmte Promotoren vermittelt wird?

Zunächst wurde die Kooperation von IRF-1 und EGFR bei der Induktion zweier synthetischer Promotoren näher untersucht. Stimulation der Zellen mit EGF bewirkt eine bis zu dreifache Aktivierung dieser Promotoren, die jedoch unabhängig von einer IRF-1-Bindung ist. Zudem wurde der konstitutive CMV-Promotor im Plasmid pMDIC+rLuc durch EGF-Stimulation ebenfalls zweifach induziert. Gemeinsam ist diesen Promotoren ein 50 bp Element aus dem CMV-Promotor. Die Induktion durch den EGFR kann entweder durch die spezifische Bindung eines aktivierenden Transkriptionsfaktors an diese Promotoren oder durch einen allgemeinen transkriptions-/translationsfördernden Effekt des EGFRs erklärt werden.

Es ist bekannt, daß die Expression von aktiviertem MEK1 verschiedene virale und andere Promotoren, in unterschiedlichem Maße aktivieren kann, darunter den CMV-Promotor bis zu vierfach (RAINGAUD *et al.*, 1996). Der Mechanismus ist unklar. Theoretisch könnte ein genereller Effekt auf Schritte wie mRNA-Prozessierung, -Export, -Stabilität oder Translation zugrundeliegen. Dagegen sprechen jedoch die deutlichen Unterschiede in der Induktionsstärke verschiedener viraler Promotoren und insbesondere, daß kaum ein Effekt auf den SV40-Promotor beobachtet wird. Auch der in dieser Arbeit verwendete MPSV-Promotor im Plasmid pMPSVHEcat wurde nicht signifikant durch EGF-Gabe beeinflusst. Es scheint deshalb wahrscheinlicher, daß bestimmte, durch MEK aktivierte Transkriptionsfaktoren diesen Effekt vermitteln.

Die Induktion der synthetischen Promotoren in den Plasmiden pGL2-CVX48 und pGL2-CVX-ISREII durch EGF-Stimulation wird durch die Expression von dominant negativem STAT5, nicht aber durch dominant negatives Ras aufgehoben (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999). Zieht man die Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, so paßt dies gut ins Bild. Die Expression der dominant negativen STAT5-Variante unterdrückt die Aktivierung von MEK durch den EGFR. Dadurch kann MEK seine Substrate, darunter die für die Induktion dieser Promotoren verantwortlichen Transkriptionsfaktoren, nicht mehr aktivieren. Die Induktion der Promotoren in den betreffenden Plasmiden unterbleibt. Dominant negatives Ras unterdrückt wahrscheinlich die MEK-Aktivierung nicht oder nicht vollständig, da EGFR

MEK auch über den PLC/PKC-Signalweg anschalten kann. Aus diesen Gründen und aus dem Fehlen von STAT-Bindungsstellen in diesen Promotoren scheint es unwahrscheinlich, daß eine Bindung von STAT-Molekülen an diese Promotoren für die Induktion durch den EGFR verantwortlich ist.

In den bisher beschriebenen transienten Assays liegen die Reporterplasmide episomal vor. Wie sieht es nun bei der Induktion von endogenen Promotoren im chromosomalen Kontext aus? Ist es denkbar, daß der EGFR die Induktion von IRF-1-responsiven Promotoren verstärkt und daß die Apoptose so lediglich durch eine sehr hohe IRF-1-Wirkung zustandekommt? Die Aktivierung des EGFRs führt zu Acetylierung und Phosphorylierung von Histonen (CHEUNG *et al.*, 2000). Dies bewirkt eine Öffnung der Chromatinstruktur und erleichtert die Transkription von Genen. Man sollte annehmen, daß das alle Gene im gleichen Maße betreffen sollte. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die Chromatinmodifikation erfolgt tatsächlich bevorzugt in EGFR-induzierten Promotorbereichen wie z.B. im c-fos-Promotor. Der Effekt kann durch Inhibition von MEK unterdrückt werden (CHEUNG *et al.*, 2000). Es scheint, daß eine Assoziation von MEK-aktivierten Transkriptionsfaktoren mit Histon-modifizierenden Proteinen die Öffnung der Chromatinstruktur auf bestimmte Bereiche beschränkt. Das heißt, daß der EGFR nicht generell die Transkription aller Gene verstärkt. Eine Verstärkung der Transkription IRF-1-induzierter Gene auf diesem Wege wäre also nur denkbar, wenn MEK-aktivierte Transkriptionsfaktoren in der Nachbarschaft von IRF-1 binden würden. Dabei ist zu bedenken, daß diese beiden Transkriptionsfaktoren auf den synthetischen Promotoren ja nicht kooperativ, sondern unabhängig voneinander wirken, d. h. es müßten tatsächlich Bindungsstellen für beide Faktoren vorhanden sein. Das könnte bedeuten, daß die verstärkte Aktivierung von Promotoren durch das Zusammenspiel von IRF-1 und EGFR Apoptose auslöst, obwohl eine geringere Aktivierung derselben Promotoren durch jeden der Faktoren alleine dies nicht bewirkt. Dies ist möglich, scheint aber nicht wahrscheinlich.

Welche Bedeutung hat die persistierende IRF-1-Aktivität?

Endogenes IRF-1 wird konstitutiv nur in geringem Maße exprimiert. Seine Aktivität wird hauptsächlich durch Aktivierung der Transkription seines Genes durch transiente Stimuli wie z. B. Cytokine reguliert. IRF-1-Effekte wie Virusresistenz und Proliferationsstop nach DNA-Schädigung sollten hingegen über längere Zeiträume erhalten bleiben, obwohl das IRF-1-Protein eine relativ kurze Halbwertszeit von lediglich einer halben Stunde aufweist (WATANABE *et al.*, 1991). Diese Arbeit zeigt, daß IRF-1 persistierende Aktivitäten induziert, die die Proliferation über mehrere Tage hinweg verlangsamen und die mit onkogenen

Signalen Apoptose auslösen können. Vermutlich beruhen diese Effekte auf einer anhaltenden Veränderung des Genexpressionsprofils der Zelle.

Nachfolgende Aktivierung des EGFRs löst Apoptose aus. Demnach scheint eine durch IRF-1 induzierte Veränderung mit dem EGFR-Signal in der Vermittlung des Zelltodes zu kooperieren.

Welche EGFR-aktivierten Signalwege spielen bei der Vermittlung der Apoptoseinduktion eine Rolle und welche Interaktionen finden zwischen ihnen statt?

Für die Entwicklung einer IRF-1-Tumorthérapie ist es wichtig, diejenigen onkogenen Signale zu identifizieren, die an der Vermittlung der Apoptose in Kooperation mit IRF-1 beteiligt sind. Phosphorylierung von MEK1/2 wurde konsistenterweise als essentielles und gemeinsames Ereignis in der Zelltodauslösung durch das Onkogen EGFR und den Tumorpromotor PMA in Zellen, in denen der Tumorsuppressor IRF-1 aktiviert wurde, identifiziert. PKC-Isoformen und p38 spielen im IRF-1/PMA-Synergismus zusätzlich eine entscheidende Rolle, während diese Signale lediglich eine geringe oder redundante Aufgabe innerhalb des IRF-1/EGFR-Synergismus` erfüllen (Abbildung 37).

MEK kann entweder über Ras, den Initiator des klassischen MAP-Kinase-Weges, oder durch alternative Signalwege aktiviert werden. Beispielsweise können α PKC und ϵ PKC Raf unterhalb von Ras aktivieren und münden somit in den MAP-Kinase-Signalweg (CAI *et al.*, 1997). Da weder dominant negatives Ras (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999) noch PKC-Inhibitoren den IRF-1/EGFR-vermittelten Zelltod in NIH3T3-Zellen effizient blockieren konnten, ist es wahrscheinlich, daß diese Signalwege als parallele Verbindungen zwischen dem EGFR und MEK genutzt werden können.

EGFR-induzierte MEK-Aktivierung ist scheinbar von der Aktivität von STAT-Proteinen abhängig, da dominant negative Varianten von STAT1 als auch von STAT5 die MEK-Phosphorylierung und konsequenterweise die ERK-Phosphorylierung, sowie den Zelltod verhindern. Die STAT1-Variante, die nicht Tyrosin-phosphoryliert werden kann, behinderte nicht die STAT5-Aktivierung und es ist unwahrscheinlich, daß die STAT5-Variante, der die Transaktivierungsdomäne fehlt, die STAT1-Phosphorylierung behindert. Es ist zudem nicht bekannt, daß STAT1/STAT5-Heterodimere gebildet werden können. Dies legt zunächst nahe, daß beide STATs benötigt werden. STAT-Proteine binden allerdings an sehr ähnliche Sequenzen und *in vitro* konnten insbesondere keine Unterschiede in der Sequenzspezifität zwischen STAT5a und STAT5b festgestellt werden (EHRET *et al.*, 2001). Schließlich ist zu

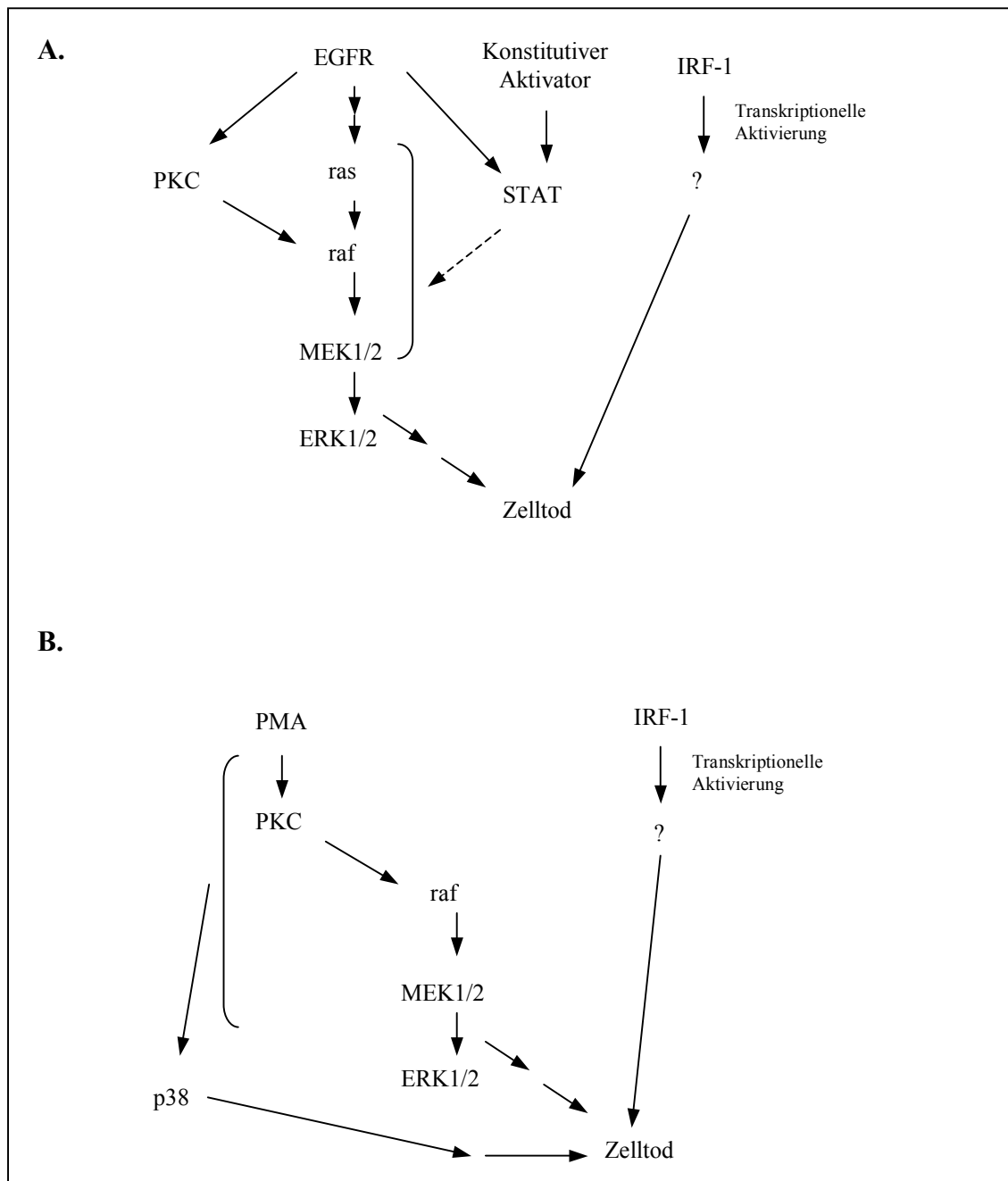


Abb. 37: Signaltransduktion im IRF-1/EGFR- und IRF-1/PMA-vermittelten Zelltod. (A) EGFR und IRF-1 kooperieren in der Vermittlung von Zelltod. Die Aktivierung von MEK ist ein entscheidender Schritt in der Signalkette. STATs werden für die EGFR-induzierte MEK-Aktivierung benötigt. Es kann jedoch sein, daß der Einfluß von STATs auf den EGFR-induzierten MAP-Kinase-Weg durch konstitutive Signale statt durch den EGFR bestimmt wird. STATs sind nicht notwendigerweise direkt in die EGFR-induzierte MAP-Kinase-Aktivierung involviert, sondern könnten auch die Transkription von Komponenten kontrollieren, die für die MAP-Kinase-Signalweg-Aktivierung benötigt werden (gestrichelter Pfeil). **(B)** PMA und IRF-1 kooperieren in der Vermittlung von Zelltod. Die Aktivierung von MEK und p38 sind essentielle Schritte. Eine Beteiligung anderer, durch den EGFR oder PMA aktivierter Proteine ist nicht gezeigt, aber denkbar.

bedenken, daß die dominant negative STAT5-Variante überexprimiert wurde, d. h. eine unspezifische Blockierung der Bindungsstellen für andere STATs in Promotoren, z.B. solche von STAT1, kann also nicht ausgeschlossen werden. Ungeklärt ist zudem, ob die benutzte STAT5a-Variante auch einen dominant negativen Effekt auf STAT5b ausübt, und somit, ob STAT5b hier eine Rolle spielt. PMA-induzierte ERK-Phosphorylierung ist hingegen unabhängig von einer STAT5-Aktivierung, da dieses Molekül nach PMA-Stimulation nicht phosphoryliert wird.

STATs könnten entweder in die Regulation mehrerer Signalwege oberhalb von MEK involviert sein, oder, was wahrscheinlicher ist, direkt die Raf-Aktivierung oder die MEK-Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung kontrollieren. Dabei muß sich die Wirkung der STATs auf die EGFR-aktivierte MEK-Phosphorylierung nicht erst im Moment der EGFR-Induktion ereignen. Es ist denkbar, daß STAT-Proteine ständig durch unbekannte Stimuli aktiviert werden. Eine antagonisierende konstitutive Dephosphorylierung würde dafür sorgen, daß die Menge an phosphoryliertem STAT im Fließgleichgewicht gering bleibt. Tatsächlich kann eine geringe Menge an phosphoryliertem STAT5 in unstimulierten NIH3T3-Zellen detektiert werden (siehe Abbildungen 27I und 28). Diese dynamische Kontrolle der STAT-Aktivität könnte essentiell sein, um die konstitutive Transkription von Komponenten zu gewährleisten, die für die MEK-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren und andere Stimuli benötigt werden. Die Expression dominant negativer STAT-Varianten würde diese Ereignisse unterbrechen und das Expressionsprofil der Zelle ändern. Aktivierung des EGFRs würde dann aufgrund fehlender oder antagonisierender Komponenten nicht zur MEK-Aktivierung führen. In diesem Szenario würde die Aktivierung der STATs durch den EGFR die MEK-Aktivierung also nicht direkt beeinflussen. Alternativ ist es auch denkbar, daß die STATs direkt an der MEK-Aktivierung durch den EGFR beteiligt sind und phosphorylierte STAT-Proteine beispielsweise eine Aufgabe als Brückenmoleküle in der Kopplung von bestimmten Schritten im MAP-Kinase-Signalweg wahrnehmen. Die genaue Aufgabe der STATs bei der MEK-Aktivierung durch den EGFR bleibt also ungeklärt.

Ungeklärt ist weiterhin ob und, wenn ja, welche anderen EGFR-induzierten Signalwege an der Apoptoseinduktion in Kombination mit IRF-1 beteiligt sind.

Welche Interaktionen finden zwischen IRF-1 und onkogenen Signalen statt und was ist der biologische Sinn der daraus resultierenden Apoptoseauslösung?

Der EGFR vermittelt verschiedene Signale. Für die Vermittlung des Wachstumssignals verwendet der EGFR offenbar nicht die gleichen Signalwege wie für die Kooperation mit

IRF-1, da die Hemmung der MEK-Aktivität nicht zu einer Verhinderung des EGF-stimulierten Proliferationsschubs führte. Die Reaktion auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren hängt nicht nur davon ab, welche Signalwege eingeschaltet werden, sondern auch vom Zelltyp und von dem Zustand, in dem sich die Zelle befindet. Die Integration von unterschiedlichen, auf eine Zelle einwirkenden Signalen kann durch Vernetzung der Signalwege offensichtlich zu biologischen Reaktionen führen, die von einem der Signale allein nicht bewirkt werden. Wo ist nun der biologische Sinn darin zu sehen, daß eine Zelle nach IRF-1-Aktivierung auf ein Wachstumssignal hin in die Apoptose geht? Oder handelt es sich hier lediglich um eine Konfliktsituation, bei der sich antagonisierende Signale, nämlich die eines Tumorsuppressors und eines Onkogens, die Zelle inadequat reagieren lassen? Es handelt sich wahrscheinlich um einen Abwehrmechanismus, der den Organismus vor der Entstehung von Tumoren schützen soll. Da der MAP-Kinase-Weg bei einer ganzen Reihe von onkogenen Transformationen dereguliert ist, scheint es folgerichtig, daß IRF-1 in Kooperation mit diesem Apoptose auslöst, um so einem breiten Spektrum an Transformationen entgegenwirken zu können. Die Art und Weise, wie IRF-1- und MEK-gesteuerte Signale zusammenwirken und wie die Apoptose letztlich vermittelt wird, bleibt zu klären. Dennoch lassen ähnliche Phänomene die Bedeutung von MEK im IRF-1-vermittelten Zelltod erahnen. So induziert Nerve Growth Factor (NGF) nach Vorbehandlung mit Interferon- γ , einem starken IRF-1-Induktor, Apoptose in PC12-Zellen. Bei unbehandelten Zellen führt NGF-Behandlung hingegen zum Wachstum von Neuriten (LOPP *et al.*, 2000). Wie für die meisten Wachstumsfaktoren ist der MAP-Kinase-Kaskade der wichtigste Signalweg für den NGF-Rezeptor TrkA (SZEBERENYI, 1996). Zudem könnten Interaktionen zwischen IRF-1 und MEK für einen Teil der Effekte verantwortlich sein, die in Interferon-basierten Therapien wirksam werden.

Wie könnte eine IRF-1-Tumorthérapie aussehen und welche Schwierigkeiten gilt es zu bedenken?

IRF-1 löst zusammen mit EGFR-Signalen Apoptose aus. Dieser Effekt ist nicht auf eine bestimmte Spezies beschränkt, da diese Arbeit zeigt, daß sowohl murine wie humane Zellen davon betroffen sind.

Die Deregulation des Signalnetzwerkes von EGFR und den anderen Mitgliedern der HER-Familie ist ein signifikanter Faktor bei der Entstehung und Progression verschiedener menschlicher Krebsarten. Mutationen von Ras und ein konstitutives Anschalten des MAP-Kinase-Weges sind häufig auftretende Merkmale von transformierten Zellen. Eine

Tumorthherapie könnte sich nun zunutze machen, daß IRF-1 in untransformierten Zellen eine andere Reaktion auslöst als in transformierten. Würde man das endogene IRF-1 z. B. durch eine geeignete Cytokinkombination in allen Zellen des Körpers aktivieren, so würde die Proliferation normaler Zellen reversibel vermindert. Bei einer kurzzeitigen IRF-1-Wirkung scheint dies unproblematisch. Transformierte Zellen hingegen würden auch nach einer kurzzeitigen Aktivierung von IRF-1 in die Apoptose gehen. Die immunstimulatorische Wirkung von IRF-1 würde zudem eine Eliminierung von Tumorzellen durch das körpereigene Abwehrsystem begünstigen. Diese selektive Eliminierung von Tumorzellen wäre insbesondere in Geweben von Interesse, die für chirurgische Eingriffe nicht zugänglich sind. Die Identifizierung von MEK als entscheidenden Faktor bei der Apoptoseinduktion durch IRF-1 eröffnet nun eine mögliche breite Anwendung bei einer Vielzahl von Tumoren.

Hier gibt es allerdings einige Probleme zu bedenken. Zum einen ist IRF-1 als ein Induktor der EGFR-Expression beschrieben (RUBINSTEIN *et al.*, 1998). IRF-1-Aktivität könnte also in normalen Zellen eine Erhöhung der Menge an EGFR auf der Zelloberfläche bewirken. Würden diese Rezeptoren durch ihren Liganden EGF aktiviert oder wäre die EGFR-Zahl so hoch, daß eine Aktivierung ohne Ligand stattfindet, so könnte dies gemeinsam mit der IRF-1-Aktivität zu Apoptose führen. Dem widersprechen Beobachtungen, wonach Zellkulturen auf eine IRF-1-Aktivierung über mehrere Tage nicht mit Apoptose reagieren. Natürliche IRF-1-Aktivierung im Körper, z. B. durch Cytokinwirkung, führt trotz der Anwesenheit von EGF in den Körperflüssigkeiten ebenfalls normalerweise nicht zu einem Absterben von Zellen. Die Induktion des EGFRs durch IRF-1 ist folglich entweder nicht stark genug oder es existieren unter diesen Bedingungen Mechanismen, die einer Apoptoseinduktion entgegensteuern.

Zum anderen scheint die IRF-1-Überexpression in bestimmten Geweben problematisch. Transgene Mäuse, die das IRF-1-Gen unter einem Enhancer der schweren Kette von Immunglobulin tragen, zeigen eine drastische Reduktion in der Anzahl an B-Lymphozyten (YAMADA *et al.*, 1991). Die IRF-1-Expression ist in diesen Mäusen auf lymphoide Gewebe beschränkt und dort konstitutiv und sehr stark. Die T-Zellpopulation zeigt trotz der Expression im Thymus keine Veränderung. Hinsichtlich einer Tumorthherapie ist zu berücksichtigen, daß immer eine transiente Erhöhung der IRF-1-Expression vorgesehen wäre.

Eine Tumorthherapie durch Erhöhung der Expression oder der Aktivität von IRF-1 ist ein vielversprechender Ansatz. Mit der Identifizierung von MEK als entscheidendem Faktor bei der Vermittlung von Apoptose in Kooperation mit IRF-1 eröffnet sich ein breites Anwendungsgebiet. Dennoch muß unter Umständen die Stärke der IRF-1-Aktivität vorsichtig angepaßt werden oder auf bestimmte Bereiche beschränkt werden.

IV. Zusammenfassung

Der Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) ist ein Transkriptionsaktivator. Cytokine wie Interferone und Interleukine und Viren gehören zu den Induktoren von IRF-1. Ein antiviraler Status der Zelle, Verlangsamung des Zellwachstums, Modulation des Immunsystems und Tumorsuppression sind typische biologische Effekte der IRF-1-Aktivierung.

Ein tumorsuppressiver Mechanismus besteht in Apoptoseinduktion durch die Kooperation von IRF-1 mit onkogenen Signalen. IRF-1-Aktivierung in untransformierten Zellen führt zu einer Wachstumsreduktion. Gleichzeitige Aktivierung von IRF-1 und Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) führt hingegen zu rapidem Zelltod. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Signaltransduktion, die diesem Phänomen zugrundeliegt. Der IRF-1/EGFR-vermittelte Zelltod konnte durch die Inhibition zweier EGFR-Signalwege, nämlich durch die Hemmung der MEK-Aktivität als auch durch die Expression dominant negativer STAT-Varianten, blockiert werden. Die Expression der STAT-Varianten unterdrückt dabei auch die MEK-Aktivierung. Folglich spielt MEK bei der Kooperation mit IRF-1 eine zentrale Rolle. Aufgrund der häufig beobachteten Deregulation des MAP-Kinase-Signalweges in verschiedenen menschlichen Krebsarten, stellt eine Erhöhung der IRF-1-Aktivität einen vielversprechenden Ansatz für eine Tumorthherapie dar.

Die proliferationshemmende Eigenschaft von IRF-1 wurde benutzt, um das Wachstum von Helferzellen bei der Kokultivierung mit Stammzellen zu drosseln. Durch IRF-1 in ihrem Wachstum regulierte Stromazellen zeigten die gleichen essentiellen Eigenschaften wie durch Bestrahlung proliferationsinhibierte Stromazellen. Insbesondere war die Produktion wichtiger Cytokine und die Expression von Oberflächenmarkern konserviert. In ihrer Aufgabe, hämatopoetische Vorläuferzellen während der *ex vivo* Kultivierung zu unterstützen, zeigten sich die IRF-1-regulierten Stromazellen mindestens ebenso effektiv wie bestrahlte Stromazellen.

Es wurde außerdem ein System entwickelt, das es erlaubt, bei einer Transfektion von Säugerzellen diejenigen Zellen zu selektieren, die das gewünschte Protein stark und stabil exprimieren. Als Beispiel wurde ein IRF-1-Fusionsprotein (IRF-1-hER) gewählt. Transfektion von Säugerzellen mit diesem Plasmid und ein hoher Selektionsdruck ermöglichten es, dieses Fusionsprotein hoch exprimierende Klonmischungen und individuelle Klone zu erhalten.

V. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Material für die molekularbiologischen Versuche

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Riedel-de Haën, Serva und Sigma bezogen. Es wurde stets Millipore-Wasser verwendet.

5.1.1.1. Puffer und Lösungen

TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH=8,0)

TBS: 5 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 3 mM KCl (pH=7,4)

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH=6,8)

5.1.1.2. Bakterienstamm und Bakterienkulturreagenzien

DH10B *Escherichia coli* von Gibco BRL

Genotyp: F⁻ *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*dlacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *nupG*

LB (Luria Bertani)-Medium und LB-Agar-Platten zur Bakterienkultivierung enthielten 50-100 µg/ml Ampicillin und wurden nach SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, Molecular Cloning hergestellt.

Sämtliche Bakterienkulturen wurden bei 37°C bebrütet.

5.1.1.3. Antikörper und Proteinmarker

Für die FACS-Analyse:

Phycoerythrin (PE)-konjugierte Antikörper: Maus IgG1, CD13, CD14, CD19, CD33, CD34, CD54 (alle von Becton Dickinson), CD10 (von Immunotech)

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Antikörper: Maus IgG1, CD15, CD45, CD71 (alle von Becton Dickinson), DIA120 (von Dianova)

Für Immunpräzipitation und Western Blot:

Anti-Phospho-ERK1/2: Maus, monoklonal (1:2000) von Upstate Biotechnology

Anti-ERK2 (D2): Maus, monoklonal (1:500) von Santa Cruz Biotechnology

Anti-Phospho-MEK1/2 (Ser217/221): Kanninchen, polyklonal (1:1000) von Cell Signaling

Anti-Phospho-Tyrosin: Maus, monoklonal (1:1000) von Cell Signaling

Anti-STAT1: Maus, monoklonal (1:2000) von Transduction Laboratories

Anti-STAT5a (L-20): Kanninchen, polyklonal (1:200), von Santa Cruz Biotechnology

Anti-H-rev107: Kanninchen, polyklonal (1:500) von Dr. Sers, Berlin

Anti-Aktin: Maus, monoklonal (1:1000) von Boehringer Mannheim

Zur Detektion polyklonaler Antikörper wurde Protein A-HRP (1:15000) von Amersham Pharmacia Biotech benutzt. Zur Detektion monoklonaler Antikörper wurde Peroxidasegekoppeltes Ziege Anti-Maus IgG (1:5000) von Dianova benutzt.

Als Proteingrößenstandards wurden der Rainbow coloured protein molecular weight marker von Amersham Life Science oder der Prestained Precision Protein Standards von Bio-Rad Laboratories verwendet.

5.1.2. Material für die Zellkultur

Plastikmaterial für die Zellkultur wurde von den Firmen Becton Dickinson, Corning, Costar, Gibco BRL, Greiner und Nunc bezogen.

5.1.2.1. Zelllinien

NIH3T3	embryonale Maus-Fibroblasten (ATCC CRL-1658)
KA1-10/96-1A	NIH3T3-Zelllinie; stabiler Einzelklon, in den der humane EGFR zusammen mit einem Hygromycin B-Resistenzplasmid und pMT7HE-IRF1-hER zusammen mit einem Neomycin-Resistenzplasmid transfiziert wurde (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999)
BHK21	Baby-Hamster Nierenzellen (ATCC CCL-10); es wurde die BHKA Sublinie (KARREMAN <i>et al.</i> , 1996) verwendet
2fTGH	humane Fibrosarcoma-Zelllinie (PELLEGRINI <i>et al.</i> , 1989)
SiHa	humane Cervix-Karzinomzelllinie (ATCC HTB-35)
L88/5	humane Stromazelllinie (THALMEIER <i>et al.</i> , 1994)
L-M(TK ⁻)	Fibroblasten-Zelllinie aus L-M Mäusen, die das Enzym Thymidin-Kinase nicht mehr exprimiert (ATCC CCL-1.3)
Vero	Nierenzellen aus Affen mit defektem IFN-Locus (ATCC CCL-81)

5.1.2.2. Viren

Vesicular Stomatitis Virus (VSV): Rhabdovirus, RNA-Virus

Sendai Virus: Paramyxovirus, RNA-Virus

5.1.2.3. Plasmide

pMT7HE: Leerer Klonierungsvektor, der den Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV)-T7-Hybridpromotor enthält (SCHAPER, 1992).

pMT7HE-IRF-1-hER: Kodiert ein Fusionsprotein aus murinem Interferon Regulatory Factor 1 und dem Hormon-bindenden Teil des humanen Östrogenrezeptors unter der Kontrolle des MPSV-T7-Promotors (KIRCHHOFF *et al.*, 1993).

pIRF-GFP-hER: Ein enhanced GFP-kodierendes PCR-Fragment wurde mithilfe der Primer P446 (5'-GCAGATCTGGTGAGCAAGGGCGAG-3') und P447 (5'-GCAGATCTGGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3') aus dem Plasmid pLAGSNP (KLIBISCH, 1998) amplifiziert, mit BglII verdaut und in die BamHI-Schnittstelle von pMT7HE-IRF-1-hER zwischen IRF-1 und hER eingesetzt. 5568 bp.

pIRF-GFP-hERneo: Ein PCR-Fragment, das ein Neomycin-Resistenzgen und ein SECIS-Element kodiert, wurde mithilfe der Primer P537 (5'-GCCAATTGAACAAGATGGATTGC-3') und P525 (5'-GCCAATTGCCAAGGCCTTGATCCAT-3') aus dem Plasmid pLAGSNPS (KLIBISCH, 1998) amplifiziert, mit MfeI verdaut und in die EcoRI-Schnittstelle von pIRF-GFP-hER hinter das IRF-1-eGFP-hER-Fusionsprotein eingesetzt. 6424 bp.

pIRF-1-hERneo: Ein Fragment wurde durch NdeI/BglII-Restriktionsverdau aus dem Plasmid pIRF-GFP-hERneo entfernt und durch ein NdeI/BglII-Restriktionsfragment, das aus dem Plasmid pMT7HE-IRF-1-hER isoliert wurde, ersetzt. Dadurch wurde die Sequenz entfernt, die eGFP kodiert. 5710 bp.

pIRF-1-hERpuro: Kodiert IRF-1-hER bicistronisch verbunden mit Puromycin-Acetyltransferase über ein Poliovirus IRES-Element unter dem MT7-Promotor (MUELLER *et al.*, 1999).

pGL2-CVX: Klonierungsvektor, der die firefly Luciferase unter einem minimalen CMV-Promotor kodiert (von Promega).

pGL2-CVX-ISREII: Kodiert firefly Luciferase unter einem IRF-1-induzierbaren Promotor (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999).

pGL2-CVX48: Kodiert firefly Luciferase unter einem IRF-1-induzierbaren Promotor (KIRCHHOFF und HAUSER, 1999).

pMPSVHEcat: Kodiert Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) unter einem konstitutiven MPSV-Promotor (ARTELT *et al.*, 1989).

pMDIC+rLuc: Kodiert die renilla Luciferase (rLuc) unter einem CMV-Promotor (erhalten von Dr. Hennecke).

pMDIS+eGFP: Kodiert das enhanced GFP unter einem SV40-Promotor (erhalten von Dr. Hennecke).

pcDNA3-hEGFR: Kodiert den humanen EGFR unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (ULLRICH *et al.*, 1984).

pcDNA3m-STAT1-WT: Kodiert das humane STAT1 α unter einem CMV-Promotor (WALTER *et al.*, 1997).

pcDNA3m-STAT1-Tyr701m: Kodiert STAT1 α mit einer Tyr701Phe-Mutation (WALTER *et al.*, 1997).

pcDNA3m-STAT1-727m: Kodiert STAT1 α mit einer Ser701Ala-Mutation (WALTER *et al.*, 1997).

pXM-STAT5a Δ 750: Kodiert AS 1-750 des murinen STAT5a (MORIGGL *et al.*, 1996).

pMBC-STAT5aGFP: Kodiert ein Fusionsprotein aus STAT5a und GFP unter der Kontrolle eines MT7-Promotors (erhalten von Dr. Groner).

p107-900+: Kodiert die H-rev107-cDNA aus der Ratte unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (SERS *et al.*, 1997).

pAG60: Kodiert die Neomycinphosphotransferase (COLBERE-GARAPIN *et al.*, 1981).

pBSpac Δ p: Kodiert die Puromycin-Acetyltransferase unter einem SV40-Promotor (DE LA LUNA *et al.*, 1988).

5.1.2.4. Zellkulturreagenzien

Als Kulturmedium für Säugerzellen wurde Dulbecco's modified Eagle Medium (DME) von Sigma mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) von Boehringer Mannheim bzw. JHR Biosciences, 100 μ g/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin von Gibco BRL, sowie 20 mM Glutamin von Serva verwendet.

Lediglich die L88/5-Zellen wurden in MEM alpha medium with Glutamax-1 von Gibco-BRL mit den entsprechenden Zusätzen von FCS und den Antibiotika kultiviert.

Trypsin-EDTA-Solution (10x) (TEP) von Sigma verdünnt in PBS wurde zum Ablösen der Zellen bei der Passagierung verwendet.

Folgende Selektionszusätze waren gegebenenfalls bei der Etablierung und Haltung stabil transfizierter Zelllinien im Medium enthalten:

700-1500 μ g/ml G418 (Neomycin) von PAA Laboratories gelöst in Wasser

1-8 μ g/ml Puromycin von Sigma gelöst in Wasser

150 U/ml Hygromycin B von Calbiochem

Die Säugerzellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

5.1.2.5. Induktoren und Inhibitoren

Die Endkonzentrationen der Induktoren/Inhibitoren im Zellkulturmedium waren wie folgt:

0,01-1 μ M β -Östradiol von Boehringer Ingelheim gelöst in Ethanol/Wasser 1:1

20 ng/ml Humaner Epidermal Growth Factor, rekombinant, aus *E. Coli*, von Sigma gelöst in 10 mM Essigsäure und 0,1% BSA
160 nM PMA von Sigma gelöst in DMSO

50 µM PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)
10 µM U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien)
5 µM BIM (2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimid)
2,6 µM SB202190 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol)
alle von Calbiochem, alle gelöst in DMSO

Für Zellwachstumsbestimmungen wurden die Inhibitoren gleichzeitig mit den Induktoren verabreicht. Für Western Blot Experimente wurden die Zellen für 45 min mit den angegebenen Inhibitoren präinkubiert.

100 µg/ml Cycloheximid von Sigma

5.2. Methoden

5.2.1. Klonierung und Plasmidpräparation aus Bakterien

5.2.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die PCR wurde PCR-Puffer, je 250 µM Nukleotide, je 100 pMol der Primer (MWG), 40 ng des Plasmids, sowie 1 U Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 100 µl verwendet.

Der Temperaturzyklus unterteilte sich in 60 s 72°C; 25 Zyklen à 50 s 94°C, 50s 40°C, 90 s 68°C; 10 min 72°C.

5.2.1.2. Manipulation von DNA

Restriktionsverdau

Zum Spalten von DNA wurden Enzyme von Boehringer Mannheim oder Biolabs verwendet.

Dialyse

Zum Entfernen von Salzen und Enzymen aus Reaktionsansätzen wurden diese als Tropfen auf eine auf Wasser schwimmende Nitrocellulosemembran (Millipore) gegeben. Nach einer halben Stunde wurde die nunmehr gereinigte DNA-enthaltende Lösung wieder aufgenommen.

Ligation

Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor zum einzusetzenden DNA-Fragment von etwa 1:4 gewählt. Es wurde die T4-DNA-Ligase (Biolabs) verwendet. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Gelen

Zur Trennung und Analyse von DNA wurden 1-2 prozentige Agarosegele und TAE-Laufpuffer bei einer Spannung von ca. 100 V benutzt. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 6xDNA-Gel-Auftragspuffer versetzt. Als Größenstandard diente die 1 kb DNA-Leiter von Gibco BRL. Die Detektion erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachen auf einem UV-Tisch. Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Quiagen verwendet.

6xDNA-Gel-Auftragspuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% Sucrose

5.2.1.3. Plasmidpräparation aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde durch Elektrottransformation bei $U=2,5$ kV, $C=25$ μ F und $R=200$ Ω in kompetente DH10B-Bakterien gebracht. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im - analytischen Maßstab wurde die Boiling-Prep-Methode verwendet.

Dazu wurden 2 ml einer Bakterienkultur für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ l STET-Puffer (8% Sucrose, 0,5% Triton, 50 mM EDTA, 10 mM Tris pH=8) resuspendiert und nach Zugabe von 50 μ l Lysozym (10 mg/ml in TAE) für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erhitzen auf 95°C für 90 s erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 14000 rpm für 5min. Nach Zugabe von etwas RNase wurde das Pellet entfernt. Zugabe von 50 μ l 8 M Ammoniumacetat und 500 μ l Isopropanol fällte die DNA. Diese wurde nach einer Zentrifugation bei 14000 rpm und einem Waschschriff in 70% Ethanol in Wasser gelöst.

RNaseA (Boehringer Mannheim): 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl (pH=7,5); erhitzt auf 100°C für 15 min

- präparativen Maßstab wurde der Maxi Plasmid Purification Kit von Quiagen verwendet.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

5.2.2. Langzeitlagerung von Zellen

Bakterienkulturen mit einer $OD_{600\text{ nm}}=1,0-2,0$ wurden 1:1 mit autoklaviertem Glycerol versetzt und bei -70°C gelagert.

Säugerzellen wurden von ihrem Kulturgefäß abgelöst, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in 95% FCS, 5% DMSO aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde langsam zunächst auf Eis und dann in einer Styroporbox auf -70°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur gelagert. Das Auftauen erfolgte zügig bei 37°C in einem Wasserbad. Durch Waschen mit Medium wurde das DMSO entfernt und die Zellen wurden zunächst ohne Selektionsdruck kultiviert.

5.2.3. Bestimmung von Zellzahlen und Proliferation von Säugerzellen

Zellzahlbestimmung

Es wurden 1×10^4 Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Induktion erfolgte sofort und dauerte soweit nicht anders erwähnt bis zum Ende des Experimentes am fünften Tag. Dann wurden die Zellen, nach einem Waschschriff mit PBS, mit 100 μ l TEP aus dem Gefäß gelöst. Es wurden 400 μ l PBS und 500 μ l Trypan Blue Solution (0,4%) von Sigma hinzugegeben. Trypanblau färbt tote nicht aber lebende Zellen, so daß diese leicht voneinander unterschieden werden können. Die Anteil toter Zellen betrug soweit nicht anders erwähnt in allen Versuchen weniger als 5%. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte durch manuelles Zählen in einem Hämacytometer.

WST-Proliferationsassay

4×10^3 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte und eine Reihe von jeweils 1:1 Verdünnungen wurden ausgesät. Die Induktion erfolgte am zweiten Tag und dauerte weitere drei Tage an. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde dann mit dem WST-1 Cell Proliferation Assay von Roche Diagnostics bestimmt.

Zellproliferationsexperimente wurden in Gegenwart von Serum und in Abwesenheit von Selektionsdruck gemacht.

5.2.4. Transfektion von Säugerzellen

Zum Transfer von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurden alternativ die Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitations-Methode oder Lipofektion mit Lipofectamine2000 von Gibco BRL angewandt. Dazu wurden die Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. 2×10^5 Zellen in einem Volumen von 2 ml Medium wurden in jedes Loch gegeben.

Bei der Calciumphosphat-Methode wurden pro Transfektionsansatz 10 µl 2,5 M CaCl₂, bis zu 5 µg DNA und Wasser in einem Volumen von 100 µl gemischt. Unter vortexen wurde daraufhin 100 µl HEBS-Puffer zugegeben. Diese Mischung wurde ins Medium geträufelt. 20 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

HEBS-Puffer: 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM NaH₂PO₄ (pH=7,1)

Stabile Transfektion

Bei stabilen Transfektionen war ein Resistenzmarkergen in der transfizierten DNA enthalten. Beim Kotransfer zweier Plasmide in die Zellen wurde ein Verhältnis von etwa 1:10 von Resistenzmarkerplasmid zum Plasmid, das das gewünschte Protein kodiert, gewählt. Die Zellen wurden weitere 24 h nach dem Medienwechsel aus ihrem Gefäß gelöst und in eine Gewebekulturschale (Ø= 14 cm) in ein Medium gegeben, daß die Selektionsdroge enthielt.

Im Falle einer stabilen Klonmischung wurden alle überlebenden Zellen und ihre Tochterzellen vereinigt und zusammen als neue Population kultiviert. Bei stabilen Einzelklonen wurden individuelle Zellklone isoliert und einzeln weiterkultiviert.

Transiente Transfektion

Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen nach weiteren 24 h, in denen gegebenenfalls ein Induktionsschritt erfolgte, mit PBS gewaschen, mit einem Schaber von dem Gefäß gekratzt und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und 4°C wurde das Zellpellet durch Zugabe von 150 µl 250 mM Tris pH=7,5 und dreimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und zügigem Auftauen im 37°C Wasserbad aufgeschlossen. Anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min bei 4°C lieferte den Zellextrakt, der für die Reporterassays verwendet wurde.

5.2.5. Reporterassays und Proteingehaltsbestimmung

Zur Bestimmung der Menge an CAT-Protein in den Lysaten wurde der CAT-Elisa von Roche Diagnostics verwendet.

Sollten die Aktivitäten von firefly und renilla Luciferase gleichzeitig in einem Lysat bestimmt werden, wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega verwendet.

Anderenfalls wurde zur Bestimmung der firefly Luciferase-Aktivität 350 µl Reaktionsmix in ein Reagenzröhrchen gegeben, 20 µl Lysat zugesetzt und das Röhrchen in ein Luminometer gesetzt. Die Maschine träufelte dann 50 µl in Reaktionsmix gelöstes Luciferin (0,2 mM) hinzu und bestimmte die Lumineszenz.

Reaktionsmix: 100 mM Glycylglycin, 100 mM ATP, 1 M MgSO₄

Die Bestimmung des Proteingehaltes in Zellysaten erfolgte durch einen BCA-Assay. Dazu wurden 10 ml BCA-A und 200 µl BCA-B vermischt. 175 µl dieser Lösung wurden in jedes Loch einer 96-Loch-Platte gegeben. 25 µl Zellysate wurde hinzu pipettiert und die Extinktion bei 570 nm nach einer Inkubation bei 60°C für ca. 30 min gemessen. Als Eichstandard wurden verschiedene Verdünnungen von Lysozym verwendet.

BCA-A: 1 g Dicarboxybiquinoline, 1,7 g Na₂CO₃, 0,16 g Na₂Taurat, 0,95 g NaHCO₃ in 100 ml Wasser (pH=11,25)

BCA-B: 4 g CuSO₄·5H₂O in 100 ml Wasser

Der Hintergrundwert, der ohne Zugabe von Lysat gemessen werden kann, wurde bei allen Assays von den erhaltenen Werten subtrahiert.

5.2.6. Messung der Cytokinproduktion

Interferontest

Insgesamt 1×10^6 L-M(TK)-Zellen (zur Messung von murinem IFN) bzw. Vero-Zellen (zur Messung von humanem IFN) wurden in eine 96-Loch-Platte gesät. Die auf Interferongehalt zu testenden Überstände wurden in mehreren Verdünnungsstufen (je 1:1) am nächsten Tag für 24 h auf die Zellen gegeben. Nach Entfernen der Überstände wurde Vesicular Stomatitis Virus (VSV) in Medium mit lediglich 5% FCS in einer Verdünnung von 1:30000 (murin; entspricht etwa 10^4 plaque forming units (pfu)) bzw. 1:20000 (human) auf die Zellen gegeben. Die Auswertung erfolgte nach 24-48 h. Enthielt der Überstand Interferon, so waren die Zellen vor der Lyse durch VSV geschützt.

TGF- β -Test

Es wurde der Quantikine human TGF- β 1 Immunoassay von R&D Systems benutzt.

5.2.7. Immunpräzipitation und Western Blot

Herstellung von Lysaten aus Säugerzellen

Nach Entfernung des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Schaber von der Kulturschale gekratzt, in 1 ml PBS aufgenommen und durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und 4 °C pelletiert. Nach Resuspension in 50 μ l Lysispuffer, 10 min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde das Zellysat als Überstand abgetrennt. Dieses Lysat kann bei -20°C eingefroren werden. Die Proteinkonzentration wurde gegebenenfalls mit dem BCA-Assay bestimmt.

Lysispuffer: PBS, 0,5% Triton, 1 mM PMSF (Proteaseninhibitor), 2 mM Na_3VO_4 , 20 mM NaF (Phosphataseninhibitoren)

Immunpräzipitation

Im Falle der Immunpräzipitation wurden dem Lysat weitere 450 μ l Lysispuffer, sowie 1-5 μ g Antikörper zugegeben und die Probe wurde für 2 h bei 4°C rotiert. Danach wurden 25 μ l in PBS gewaschene Protein A/G PLUS-Agarose von Santa Cruz zugegeben und die Probe wurde für 1,5 h bei 4°C rotiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm und 4°C wurde danach der Überstand abgetrennt. Das Pellet wurde in vier Zyklen für 3 min in Waschpuffer rotiert und bei 3000 rpm für 4 min zentrifugiert, um die Waschlösung wieder abzutrennen. Am Ende wurde das Pellet in 30 μ l Proteinauftragspuffer gelöst, für 5 min unter Schütteln auf 90°C erhitzt und danach für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Waschpuffer: 1% Triton, 10 mM Tris pH=7,5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung der Proteine wurde ein zweischichtiges Gel verwendet.

Trenngel (10%): 7,1 ml Acrylamid/Bisacrylamid (Mischung aus 100 ml Rotiphorese A und 46 ml Rotiphorese B von Roth), 5 ml Gelpuffer, 2 ml Glycerol, 0,9 ml Wasser, 15 μ l TEMED und 75 μ l 10% APS

Sammelgel (4%): 1,2 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 1,5 ml Gelpuffer, 3,5 ml Wasser, 5 μ l TEMED und 50 μ l 10% APS

Anodenpuffer wurde in die äußere Kammer der Elektrophoreseapparatur gefüllt und Kathodenpuffer in die innere. Die Proben wurden, soweit nicht schon geschehen, 1:1 mit Proteinauftragspuffer versetzt und für 5 min auf 90°C erhitzt. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 13000 rpm wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei ca. 80 V.

Gelpuffer: 3 M Tris, 0,3% SDS, mit HCl auf pH=8,5 eingestellt

Anodenpuffer: 200 mM Tris mit HCl auf pH=8,9 eingestellt

Kathodenpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1% SDS mit HCl auf pH=8,25 eingestellt

Proteinauftragspuffer: 100 mM Tris pH=6,8, 24% Glycerin, 8% SDS, 0,02% Serva Blue G, 2% Mecoethanol

Western Blot

Für den Semi-dry-Blot wurden von unten nach oben ein Extra Thick Blot Paper von Bio-Rad, eine Hybond ECL Nitrocellulose Membran von Amersham Pharmacia Biotech, das Gel und ein weiteres Blotpapier auf die Blotapparatur gelegt. Die Membran und die Filterpapiere wurden vorher in Blotpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 45 min bei 15 V.

Blotpuffer: 25mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

Detektion

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation für 1 h in 5% Milchpulver in TBS blockiert. Nach einem Waschschrift wurde der erste Antikörper in TBS, 0,01% Tween bei 4 °C über Nacht auf die Membran gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper oder Protein A-HRP wieder in TBS, 0,01% Tween für 1 h inkubiert. Nach mehreren Waschschriften erfolgte die Detektion mit ECL und ECL-Filmen von Amersham Pharmacia Biotech. Entwickler und Fixierer wurden von Agfa bezogen.

Sollte auf der Membran ein weiteres Protein detektiert werden, so wurde die Membran in Strip-Puffer für 30 min bei 50 °C inkubiert, danach gewaschen und einer weiteren Detektionsrunde unterworfen.

Strip-Puffer: 100 mM Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH=6,7

5.2.8. FACS-Analyse

Nach dem Ablösen und Waschen wurden 5×10^4 Zellen in 1 ml eiskaltem PBS mit 1% FCS und 0,1% Natriumazid aufgenommen. Sollten Oberflächenmarker analysiert werden, wurden je 5 µl eines PE- bzw. eines FITC-gekoppelten Antikörpers zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen und Fixierung mit PBS, 2% Formaldehyd erfolgte die Analyse mit dem FACS-Gerät.

5.2.9. Kokultur von hämatopoetischen Stammzellen und Stromazellen

Isolierung von CD34⁺-Zellen

Diese Zellen wurden durch G-CSF-Gabe aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders mobilisiert und durch Leukapherese aus dem peripheren Blut über CliniMACS columns von Miltenyi Biotec aufgereinigt. Die Präparationen enthielten 86% CD34⁺-Zellen.

Kokultur von CD34⁺-Zellen und Stromazellen

5×10^4 Stromazellen wurden je Loch in 12-Loch-Platten gesät. L88I-Zellen wurden durch 24 h Östrogenzugabe wachstumsinhibiert, L88/5-Zellen durch vorherige Bestrahlung mit 10 Gy für 90 s. Das Medium wurde danach ersetzt durch basal ISCOVE-Medium (Biochrom), 12,5% Pferdeserum (Cansera), 12,5% FCS (Hyclone), 10 ng/ml Interleukin-3, 10 ng/ml Granulocyte-Colony Stimulating Factor, 50 ng/ml Flt3-Ligand, 50 ng/ml Stem Cell Factor, 50 ng/ml Thrombopoetin (alle von BioConcept) mit 2×10^5 bzw. 3×10^5 CD34⁺-Zellen. Nach drei und sechs Tagen Inkubation wurden die nicht-adhärenenten und adhärenenten Zellen geerntet.

Koloniebildungstest

400 (Tag 0), 700 (Tag 3) oder 1000 (Tag 6) hämatopoetische Zellen wurden in die Methylcellulose Methocult GF H4434 von Cell Systems gegossen. Nach Inkubation für 14 Tage wurden Kolonien von mehr als 50 Zellen gezählt.

VI. Literatur

- Abdollahi A., Lord K.A., Hoffman-Liebermann B., Liebermann D.A. (1991). Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. *Cell Growth Differ.* 2, 401-407
- Artelt P., Morelle C., Ausmeier M., Fitzek M., Hauser H. (1989). Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68, 213-219
- Benech P., Vigneron M., Peretz D., Revel M., Chebath J. (1987). Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A) synthetase gene. *MCB* 7, 4498-4504
- Bennaceur-Griscelli A., Tourino C., Izac B., Vainchenker W., Coulombel L. (1999). Murine stromal cells counteract the loss of long-term culture-initiating cell potential induced by cytokines in CD34⁺CD38^{low/neg} human bone marrow cells. *Blood* 94, 529-538
- Boulton J., Fidler C., Lewis S., MacCarthy A., Sheridan H., Kelly S., Oscier D., Buckle V.J., Wainscoat J.S. (1993). Allelic loss of IRF-1 in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: retention of IRF-1 on the 5q-chromosome in some patients with the 5q-syndrome. *Blood* 82, 2611-2616
- Breems D.A., Blokland E.A.W., Siebel K.E., Mayen E.M., Engels L.J.A., Ploemacher R.E. (1998). Stroma-Contact Prevents Loss of Hematopoietic Stem Cell Quality During Ex Vivo Expansion of CD34⁺ Mobilized Peripheral Blood Stem Cells. *Blood* 91, 111-117
- Brittinger G., Hellriegel K.P., Hiddemann W. (1997). Chronische lymphatische Leukämie und Haarzellenleukämie. *Medizinische Klinik* 92, 309-312
- Brown R., Marshall C.J., Pennie S.G., Hall A. (1984). Mechanism of activation of n N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT100. *EMBO J.* 3, 1321-1326
- Cai H., Smola U., Wixler V., Eisenmann-Tappe I., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Rapp U., Cooper G.M. (1997). Role of Diacylglycerol-Regulated Protein Kinase C Isotypes in Growth Factor Activation of the Raf-1 Protein Kinase. *MCB* 17, 732-741
- Chatterjee-Kishore M., Wright K.L., Ting J.P.-Y., Stark G.R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* 19, 4111-4122
- Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M., Allis C.D. (2000). Synergistic Coupling of Histone H3 Phosphorylation and Acetylation in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. *Molecular Cell* 5, 905-915
- Chin Y.E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R.A., Fu X.Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *MCB* 17, 5328-5337
- Choubey D., Lengyel P. (1995). Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *JBC* 270, 6134-6140
- Clausen J., Stockschrader M., Fehse N., Hassan H.T., Gabl C., Zander A.R. (2000). Blood-derived macrophage layers in the presence of hydrocortisone support myeloid progenitors in long-term cultures of CD34⁺ cord blood and bone marrow cells. *Ann. Hematol.* 79, 59-65
- Cohen B.D., Siegall C.B., Bacus S., Foy L., Green J.M., Hellstrom I., Hellstrom K.E., Fell H.P. (1998). Role of epidermal growth factor receptor family members in growth and differentiation of breast carcinoma. *Biochem. Soc. Symp.* 63, 199-210
- Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Khouilsky P., Garapin A.C. (1981) A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150, 1-13

- David M., Petricoin E., Benjamin C., Pine R., Weber M.J., Lerner A.C. (1995). Requirement for MAP Kinase (ERK2) Activity in Interferon α - and Interferon β -Stimulated Gene Expression Through STAT Proteins. *Science* 269, 1721-1723
- Dent P., Haser W., Haystead T.A.J., Vincent L.A., Roberts T.M., Sturgill T.W. (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257, 1404-1407
- Ehret G.B., Reichenbach P., Schindler U., Horvath C.M., Fritz S., Nabholz M., Bucher P. (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *JBC* 276, 6675-6688
- Escalante C.R., Yie J., Thanos D., Aggarwal A.K. (1998). Structure of IRF-1 with bound DANN reveals determinants of interferon regulation. *Nature* 391, 103-106
- Fujita T., Reis L.F.L., Watanabe N., Kimura Y., Taniguchi T., Vilcek J. (1989a). Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon- β mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *PNAS* 86, 9936-9940
- Fujita T., Kimura Y., Miyamoto M., Barsoumian E.L., Taniguchi T. (1989b). Induction of endogenous IFN- α and IFN- β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* 337, 270-272
- Geserick C., Bonarius H.P.J., Kongerslev L., Hauser H., Mueller P.P. (2000). Enhanced Productivity During Controlled Proliferation of BHK Cells in Continuously Perfused Bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 266-274
- Goh K.C., Haque S.J., Williams B.R.G. (1999). p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J.* 18, 5601-5608
- Gullick W.J. (1998). Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem. Soc. Sym.* 63, 193-198
- Hajnal A., Klemenz R., Schäfer R. (1994). Subtraction cloning of H-rev107, a gene specifically expressed in H-ras resistant fibroblasts. *Oncogene* 9, 479-490
- Harada H., Fujita T., Miyamoto M., Kimura Y., Maruyama M., Furia A., Miyata T., Taniguchi T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729-739
- Harada H., Kitagawa M., Tanaka N., Yamamoto H., Harada K., Ishihara M., Taniguchi T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259, 971-974
- Harada H., Kondo T., Ogawa S., Tamura T., Kitagawa M., Tanaka N., Lamphier M.S., Hisamura H., Taniguchi T. (1994). Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia: a possible mechanism of tumor suppression inactivation. *Oncogene* 9, 3313-3320
- Hobart M., Ramassar V., Goes N., Urmson J., Halloran P.F. (1996). The induction of class I and II major histocompatibility complex by allogeneic stimulation is dependent on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1): observations in IRF-1 knockout mice. *Transplantation* 62, 1895-1901
- Hogge D.E., Lansdorp P.M., Reid D., Gerhard B., Eaves C.J. (1996). Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 88, 3765-3773
- Horvath C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *TIBS* 25, 496-502
- Humphries R.K., Eaves A.C., Eaves C.J. (1981). Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *PNAS* 78, 3629-3633
- Husmann K., Sers C., Fietze E., Mincheva A., Lichter P., Schäfer R. (1998). Transcriptional and translational downregulation of Hrev107, a class I tumour suppressor gene located on the human chromosome 11q11-12. *Oncogene* 17, 1305-1312

Ibelgauf H. (1995). Dictionary of Cytokines. VCH, Weinheim

Johnstone R.W., Trapani J.A. (1999). Transcription and Growth Regulatory Functions of the HIN-200 Family of Proteins. *MCB* 19, 5833-5838

Jonasch E., Haluska F.G. (2001). Interferon in Oncological Practice: Review of Interferon Biology, Clinical Applications, and Toxicities. *The Oncologist* 6, 34-55

Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J., Mak T.W., Taniguchi T., Vilcek J. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615

Karp C.L., Biron C.A., Irani D.N. (2000). Interferon β in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunology Today* 21, 24-28

Karreman C., Karreman S., Hauser H. (1996). Retroviral infection of Syrian hamster BHK cells depends on age and susceptibility towards sialidase. *Virology* 220, 46-50

Kato Y., Tapping R.I., Huang S., Watson M.H., Ulevitch R.J., Lee J.-D. (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395, 713-716

Kendall J.M., Badminton M.N. (1998). *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *TIBTECH* 16, 216-224

Kirchhoff S., Schaper F., Hauser H. (1993). Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. *Nucleic Acids Research* 21, 2881-2889

Kirchhoff S., Koromilas A.E., Schaper F., Grashoff M., Sonenberg N., Hauser H. (1995). IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene* 11, 439-445

Kirchhoff S., Kröger A., Cruz H., Tümmeler M., Schaper F., Köster M., Hauser H. (1996). Regulation of cell growth by IRF-1 in BHK-21 cells. *Cytotechnology* 22, 147-156

Kirchhoff S., Hauser H. (1999). Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis. *Oncogene* 18, 3725-3736

Klibisch S. (1998). Konstruktion von Vektoren zur vereinfachten Selektion hochexprimierender Zellklone in Säugetierzellen. Diplomarbeit

Kollmus H., Flohe L., McCarthy J.E.G. (1996). Analysis of eukaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine. *Nucleic Acids Research* 24, 1195-1201

Kovarik P., Stoiber D., Evers P.A., Menghini R., Neining A., Gaestel M., Cohen P., Decker T. (1999). Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN- γ uses a different signaling pathway. *PNAS* 96, 13956-13961

Kröger A., Ortmann D., Krohne T.U., Mohr L., Blum H.E., Hauser H., Geissler M. (2001). Growth Suppression of the Hepatocellular Carcinoma Cell line Hepa1-6 by an Activatable Interferon Regulatory Factor-1 in Mice. *Cancer Research* 61, 2609-2617

Kuchinke W., Hart R.P., Jonakait G.M. (1995). Identification of mRNAs Regulated by Interferon- γ in Cultured Rat Astrocytes by PCR Differential Display. *Neuroimmunomodulation* 2, 347-355

Lembo D., Angeretti A., Benefazio S., Hertel L., Gariglio M., Novelli F., Landolfo S. (1995). Constitutive expression of the interferon-inducible protein p202 in NIH3T3 cells affects cell cycle progression. *J. Biol. Regul. Hemost. Agents* 9, 42-46

Lin R., Hiscott J. (1999). A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol. Cell Biochem.* 191, 169-180

- Liu W.S., Heckman C.A. (1998). The Sevenfold Way of PKC Regulation. *Cell. Signal.* 10, 529-542
- Lopp A., Kuusksalu A., Samuel K., Kelve M. (2000). Expression and activity of 2-5A synthetase in the course of differentiation and apoptosis of PC12 cells. *Cytokine* 12, 737-741
- de la Luna S., Soria I., Pulido D., Ortin J., Jimenez A. (1988). Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene* 62, 121-126
- Mamane Y., Heylbroeck C., Genin P., Algarte M., Servant M.J., LePage C., DeLuca C., Kwon H., Lin R., Hiscott J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1-14
- Masumi A., Wang I.M., Lefebvre B., Yang X.J., Nakatani Y., Ozato K. (1999). The histone acetylase PCAF is a phorbol-ester-inducible coactivator of the IRF family that confers enhanced interferon responsiveness. *MCB* 19, 1810-1820
- Matsuyama T., Kimura T., Kitagawa M., Pfeffer K., Kawakami T., Watanabe N., Kündig T.M., Amakawa R., Kishihara K., Wakeham A., Potter J., Furlonger C.L., Narendran A., Suzuki H., Ohashi P.S., Paige C.J., Taniguchi T., Mak T.W. (1993). Targeted Disruption of IRF-1 or IRF-2 Results in Abnormal Type I IFN Gene Induction and Aberrant Lymphocyte Development. *Cell* 75, 83-97
- Miettinen P.J., Berger J.E., Meneses J., Phung P., Pedersen R.A., Werb Z., Derynk R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376, 337-341
- Min W., Ghosh S., Lengyel P. (1996). The Interferon-inducible p202 Protein as a Modulator of Transcription: Inhibition of NF- κ B, c-Fos and c-Jun Activities. *MCB* 16, 359-368
- Miyamoto M., Fujita T., Kimura Y., Maruyama M., Harada H., Sudo Y., Miyata T., Taniguchi T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to the IFN- β gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913
- Moriggl R., Gouilleux-Gruart V., Jähne R., Berchtold S., Gartmann C., Liu X., Hennighausen L., Sotiropoulos A., Groner B., Gouilleux F. (1996). Deletion of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of MGF-Stat5 Results in Sustained DNA Binding and a Dominant Negative Phenotype. *MCB* 16, 5691-5700
- Mueller P.P., Schlenke P., Nimtz M., Conradt H.S., Hauser H. (1999). Recombinant Glycoprotein Product Quality in Proliferation-Controlled BHK-21 Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 529-536
- Nelson N., Marks M.S., Driggers P.H., Ozato K. (1993). Interferon consensus binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *MCB* 13, 588-599
- Nguyen H., Hiscott J., Pitha P.M. (1997a). The Growing Family of Interferon Regulatory Factors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 8/4, 293-312
- Nguyen H., Lin R., Hiscott J. (1997b). Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF-1 or IRF/RelA fusion proteins. *Oncogene*, 15, 1425-1435
- Nozawa H., Oda E., Ueda S., Tamura G., Maesawa C., Muto T., Taniguchi T., Tanaka N. (1998). Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. *Int. J. Cancer* 77, 522-527
- Olayioye M.A., Beuvink I., Horsch K., Daly J.M., Hynes N.E. (1999). ErbB Receptor-induced Activation of Stat Transcription Factors Is Mediated by Src Tyrosine Kinases. *JBC* 274, 17209-17318
- Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159-3167
- Otheki T., Yoshida H., Matsuyama T., Duncan G.S., Mak T.W., Ohashi P.S. (1998). The Transcription Factor Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) Is Important during Maturation of Natural Killer 1.1+ T Cell Receptor- α/β + (NK1+ T) Cells, Natural Killer Cells, and Intestinal Intraepithelial T Cells. *J. Exp. Med.* 187, 967-972
- Pawson T., Saxton T.M. (1999). Signaling Networks-Do All Roads Lead to the Same Genes? *Cell* 97, 675-678

- Pellegrini S., John J., Shearer M., Kerr I.M., Stark G.R. (1989). Use of a Selectable Marker Regulated by Alpha Interferon To Obtain Mutations in the Signaling Pathway. *MCB* 9, 4605-4612
- Pircher T.J., Petersen H., Gustafsson J.A., Haldosen L.-A. (1999). Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Interacts with Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5a. *Molecular Endocrinology* 13, 555-565
- Quesada J.R. (1987). Alpha Interferons in Hairy Cell Leukaemia: A Clinical Model of Biological Therapy for cancer. *Interferon* 8, 111-134
- Raingaud J., Whitmarsh A.J., Barrett T., Derijard B., Davis R.J. (1996). MKK3- and MKK6-Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *MCB* 16, 1247-1255
- Ramana C.V., Grammatikakis N., Chernov M., Nguyen H., Chuan Goh K., Williams B.R.G., Stark G.R. (2000a). Regulation of c-myc expression by IFN- γ through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 19, 263-272
- Ramana C.V., Chatterjee-Kishore M., Nguyen H., Stark G.R. (2000b). Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19, 2619-2627
- Rubinstein Y.R., Proctor K.N., Bergel M., Murphy B., Johnson A.C. (1998). Interferon regulatory factor-1 is a major regulator of epidermal growth factor receptor gene expression. *FEBS Letters* 431, 268-272
- Ruff-Jamison S., Chen K., Cohen S. (1995). Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat5 in mouse liver. *PNAS* 92, 4215-4218
- Sachs A.B. (2000). Cell Cycle-Dependent Translation Initiation: IRES Elements Prevail. *Cell* 101, 243-245
- Salomon, D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183-232
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Schaper F. (1992). Untersuchungen zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-1 durch gezielte Mutagenese. Diplomarbeit
- Schaper F., Kirchhoff S., Posern G., Köster M., Oumard A., Sharf R., Levi B.-Z., Hauser H. (1998). Functional domains of interferon regulatory factor I (IRF-1). *Biochem. J.* 335, 147-157
- Schulze H., Ballmaier M., Welte K., Germeshausen M. (2000). Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Exp. Hematol.* 28, 294-304
- Schwarz D.A., Katayama C.D., Hedrick, S.M. (1998). Schlafen, a New Family of Growth Regulatory Genes that Affect Thymocyte Development. *Immunity* 9, 657-668
- Sers C., Emmenegger U., Husmann K., Bucher K., Andres A.-C., Schäfer R. (1997). Growth-inhibitory Activity and Downregulation of the Class II Tumor-suppressor Gene H-rev107 in Tumor Cell Lines and Experimental Tumors. *J. Cell Biol.* 136, 935-944
- Shual K., Ziemiecki A., Wilks A.F., Harpur A.G., Sadowski H.B., Gilman M.Z., Darnell J.E. (1993). Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366, 580-583
- Sitnicka E., Ruscetti F.W., Priestley G.V., Wolf N.S., Bartelmez S.H. (1996) Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 88, 82-88
- Sonenberg N. (1990). Poliovirus translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 161, 23-47

- Sperandio S., de Belle I., Bredesen D.E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *PNAS* 97, 14376-14381
- Stabel S. (1994). Protein kinase C-an enzyme and its relatives. *Sem. Cancer Biol.* 5, 277-284
- Stancato L.F., Yu C.-R., Petricoin E.F., Lerner A.C. (1998). Activation of Raf-1 by Interferon γ and Oncostatin M Requires Expression of the Stat1 Transcription Factor. *JBC* 273, 18701-18704
- Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J.L., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921
- Sun H., Charles C.H., Lau L.F., Tonks N.K. (1993). MPK-1 (3CH134), an Immediate Early Gene Produkt, Is a Dual Specificity Phosphatase That Dephosphorylates MAP Kinase In Vivo. *Cell* 75, 487-493
- Szeberenyi J. (1996). Gene activation pathways of nerve growth factor signaling: A minireview. *Neurobiology* 4, 1-11
- Tamura G., Ogasawara S., Nishizuka S., Sakata K., Maesawa C., Suzuki Y., Terashima M., Saito K., Satodate R. (1996). Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer Res.* 56, 612-615
- Tan R.S., Taniguchi T., Harada H. (1996). Identification of the lysyl oxidase gene as target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression. *Cancer Research* 56, 2417-2421
- Tanaka N., Kawakami T., Taniguchi T. (1993). Recognition DNA Sequences of Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) and IRF-2, Regulators of Cell Growth and the Interferon System. *MCB* 13, 4531-4538
- Tanaka N., Ishihara M., Kitagawa M., Harada H., Kimura T., Matsuyama T., Lamphier M.S., Aizawa S., Mak T.W., Taniguchi T. (1994). Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* 77, 829-839
- Tanaka N., Ishihara M., Lamphier M.S., Nozawa H., Matsuyama T., Mak T.W., Aizawa S., Tokino T., Oren M., Taniguchi T. (1996). Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 382, 816-818
- Taniguchi T. (1997). Transcription Factors IRF-1 and IRF-2: Linking the Immune Responses and Tumor Suppression. *J. Cell. Physiology* 173, 128-130
- Teixido J., Hemler M.E., Greenberger J.S., Anklesaria P. (1992). Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Invest.* 90, 358-367
- Thalmeier K., Meißner P., Reisbach G., Falk M., Brechtel A., Dörmer P. (1994). Establishment of Two Permanent Human Bone Marrow Stromal Cell Lines With Long-term Post Irradiation Feeder Capacity. *Blood* 83, 1799-1807
- Thalmeier K., Meißner P., Reisbach G., Hültner L., Mortensen B.T., Brechtel A., Oostendorp R.A.J., Dörmer P. (1996). Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Experimental Hematology* 24, 1-10
- Thanos D., Maniatis T. (1995). Virus Induction of Human IFN β Gene Expression Requires the Assembly of an Enhanceosome. *Cell* 83, 1091-1100
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissin P., Boursier E., Loriolle F., Duhamel L., Charon D., Kirilovsky J. (1991). The Bisindolymaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C. *JBC* 266, 15771-15781
- Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A., Schlessinger J., Downward J., Mayes E.L.V., Whittle N., Waterfield M.D., Seeburg P.H. (1984). Human

epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425

Walter M.J., Look D.C., Tidwell R.M., Roswit W.T., Holtzman M.J. (1997). Targeted Inhibition of Interferon-gamma-dependent Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Expression Using Dominant-Negative Stat1. *JBC* 272, 28582-28589

Wang I.-M., Blanco J.C.G., Tsai S.Y., Tsai M.-J., Ozato K. (1996). Interferon regulatory factors and TFIIB cooperatively regulate interferon-responsive promoter activity in vitro and in vivo. *MCB* 16, 6313-6324

Watanabe N., Sakakibara J., Hovanessian A.G., Taniguchi T., Fujita T. (1991). Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Research* 19, 4421-4428

Wen Y., Yan D.-H., Spohn B., Deng J., Lin S.-Y., Hung M.-C. (2000). Tumor Suppression and Sensitization to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis by an Interferon-inducible Protein, p202, in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 60, 42-46

Wen Z., Zhong Z., Darnell J.E. (1995). Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serin phosphorylation. *Cell* 82, 241-250

White L.C., Wright K.L., Felix N.J., Ruffner H., Reis L.F., Pine R., Ting J.P. (1996). Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8⁺ T cells in IRF-1^{-/-} mice. *Immunity* 5, 365-376

Willman C.L., Sever C.E., Pallavicini M.G., Harada H., Tanaka N., Slovak M.L., Yamamoto H., Harada K., Meeker T.C., List A.F., Taniguchi T. (1993). Deletion of IRF-1, Mapping to Chromosome 5q31.1, in Human Leukemia and Preleukemic Myelodysplasia. *Science* 259, 968-971

Wu J., Harrison J.K., Dent P., Lynch K.R., Weber M.J., Sturgill T.W. (1993). Identification and Characterization of a New Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, MKK2. *MCB* 13, 4539-4548

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E. (1995). Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science* 270, 1326-1331

Yamada G., Ogawa M., Akagi K., Miyamoto H., Nakano N., Itoh S., Miyazaki J.-I., Nishikawa S.-I., Yamamura K.-I., Taniguchi T. (1991). Specific depletion of th B-cell population induced by aberrant expression of human interferon regulatory factor 1 gene in transgenic mice. *PNAS* 88, 532-536

Yan D.-H., Wen Y., Spohn B., Choubey D., Gutterman J.U., Hung M.-C. (1999). Reduced growth rate and transformation phenotype of the prostate cancer cells by an interferon-inducible protein, p202. *Oncogene* 18, 807-811

Yim J.H., Wu S.J., Casey M.J., Norton J.A., Doherty G.M. (1997). IFN regulatory factor-1 gene transfer into aggressive, nonimmunogenic sarcoma suppress the malignant phenotype and enhances immunogenicity in syngenic mice. *J. Immunol.* 158, 1284-1292

Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E. (1994). Stat3: A STAT Family Member Activated by Tyrosine Phosphorylation in Response to Epidermal Growth Factor and Interleukin-6. *Science* 264, 95-98

Zipori D., Lee F. (1988) Introduction of interleukin-3 gene into stromal cells from the bone marrow alters hemopoietic differentiation but does not modify stem cell renewal. *Blood* 71, 586-596

VII. Abkürzungsverzeichnis

BFU	Burst Forming Unit
BHK	Baby Hamster Kidney
BIM	Bisindoylylmaleimid
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	Cluster of Differentiation
CFC	Colony Forming Cell
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalovirus
d	Tag(e)
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	Östrogen
EGF	Epidermal Growth Factor
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
fLuc	firefly Luciferase
GAS	Interferon- γ Activated Sequence
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
h	Stunde(n)
hER	humaner Östrogenrezeptor (Carboxy-Terminus)
HER	Human Epidermal Growth Factor-like Receptor
HIN-200	Hemopoietic IFN-inducible Nuclear protein with a 200-amino-acid repeat
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICSBP	Interferon Consensus Sequence Binding Protein
IFN	Interferon
Il	Interleukin
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal protein Kinase
M	molar, [mol/l]
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-activated ERK-Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPSV	Myeloproliferative Sarcoma Virus
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OASE	Oligoadenylatzyklase
OD	Optische Dichte
PKC	Proteinkinase C
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS	Phosphatidylserin
rLuc	renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
SECIS	Selenocysteine Insertion Sequence
SH2	Src Homology 2
Slfn	Schlafen
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
w/o	ohne
z. B.	zum Beispiel

VIII. Danksagung

... ganz besonders an Dr. Hansjörg Hauser, nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern auch für das stete Interesse an meiner Arbeit, seine motivierende Begeisterung für die Wissenschaft und die besondere Fähigkeit, Dinge schon verstanden zu haben, bevor ich den entsprechenden Satz beendet hatte.

... dem Prüfungskomitee, bestehend aus Prof. Dr. Jürgen Bode, Prof. Dr. Brigitte Jockusch und Prof. Dr. Ralf Mendel, für seine freundliche Zusage, die Arbeit zu beurteilen.

... meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe RDIF, insbesondere Dr. Peter P. Müller und den Mitgliedern des „Interferonclubs“ für technische Hilfe, Diskussion und Anregung. An diesen Freitags-Club-Nachmittagen ist die ein oder andere gute Idee geboren worden...

... Raili Jantunen und Luis Grimm für ihre Hilfe und nette Gesellschaft während ihrer Praktikumsaufenthalte an der GBF. Finnland und Äquador sind für mich nun keine schwarzen Flecken mehr auf der Landkarte.

...den Kooperationspartnern an der Universitätsklinik Frankfurt, insbesondere Dr. Steffen Koschmieder und Sandra Wagner, für die Zusammenarbeit bei den Stromazellen und die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

... Dr. Christine Sers an der Charité Berlin für die Kooperation bei H-rev107.

... Dr. Michael J. Holtzman für die STAT1-Expressionsplasmide und Dr. Mathias Schmidt für das zur Verfügung stellen der SiHa-Zelllinie.

Diese Arbeit ist meiner geliebten Mutter Rosemarie Schroeder gewidmet, die während meiner Doktorandenzeit an den Folgen eines Krebsleidens starb.